

UNIVERZITA PARDUBICE  
Fakulta chemicko-technologická  
Katedra analytické chemie

**IDENTIFIKACE PRODUKTŮ VZNIKLÝCH KONVERZÍ VYBRANÝCH  
AMINOKYSELIN PO JEJICH IZOTACHOFRETICKÉ SEPARACI**

Bc. Tereza Dušková

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2018

UNIVERSITY OF PARDUBICE  
Faculty of Chemical Technology  
Department of Analytical Chemistry

**IDENTIFICATION OF THE PRODUCTS RESULTING FROM THE  
CONVERSION OF THE SELECTED AMINO ACIDS AFTER THEIR  
ISOTACHOPHORETIC SEPARATION**

Bc. Tereza Dušková

MASTER THESIS

2018

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2017/2018

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Tereza Dušková**  
Osobní číslo: **C16539**  
Studijní program: **N1407 Chemie**  
Studijní obor: **Analytická chemie**  
Název tématu: **Identifikace produktů vzniklých konverzí vybraných aminokyselin po jejich izotachoforetické separaci**  
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

### Zásady pro vypracování:

1. Seznamte se s problematikou vybraných aminokyselin (prolin, hydroxyprolin, kys. asparagová, asparagin), zaměřte se na jejich fyzikální a chemické vlastnosti a způsoby reakce s různými látkami.
2. Proveďte rešerši na téma stanovení těchto aminokyselin pomocí různých analytických metod, zaměřte se především na elektromigrační separační metody.
3. V experimentální části proveďte izotachoforetickou separaci vybraných aminokyselin, během níž odeberte frakce jednotlivých látek a stanovte, o jaké látky se jedná, poté navrhnete způsob, jakým vybrané aminokyseliny reagují s kyselinou dusitou.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Podle pokynů vedoucího práce.**

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Martin Bartoš, CSc.**

Katedra analytické chemie

Konzultant diplomové práce: **Ing. Michaela Kovářová**

Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce: **20. února 2018**

Termín odevzdání diplomové práce: **11. května 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2018

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškerá použitá literatura, kterou jsem v práci použila, je uvedena v seznamu literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon. Je mi známo, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 9.5.2018

Bc. Tereza Dušková

Ráda bych poděkovala všem, kteří mě podporovali při psaní diplomové práce. Mé díky patří zejména Ing. Martinu Bartošovi, CSc. za konzultace během psaní, za odbornou pomoc a řadu potřebných informací, dále Ing. Robertu Jiráskovi Ph.D. za změření MS spekter a Ing. Michaele Kovářové za neúnavné vedení při laboratorním výzkumu. Ráda bych také poděkovala své rodině, která mi studium umožnila a po celou dobu mě podporovala.

## **ANOTACE**

Tato diplomová práce je tvořena dvěma částmi – teoretickou a experimentální. První část je zaměřena na aminokyseliny. Nejprve je pojednáváno obecně o aminokyselinách, jejich struktuře, rozdělení a vlastnostech. Dále se diplomová práce zabývá reakcemi aminokyselin, jejich stanovením, a nakonec jsou zmíněny podrobnější informace o vybraných aminokyselinách (prolin, hydroxyprolin, kyselina asparagová a asparagin).

Druhá část je zaměřena na konverzi vybraných aminokyselin pomocí van Slykeovy reakce, což je reakce aminokyseliny s dusitanem sodným a kyselinou octovou. Vzniklé sloučeniny jsou izotachoforeticky analyzovány v aniontovém modu. Během analýzy jsou odebírány v určitém čase za pomoci mikropreparativního kohoutu a následně ověřena jejich struktura pomocí hmotnostní spektrometrie.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Aminokyseliny, prolin, hydroxyprolin, asparagin, kyselina asparagová, konverze, van Slykeova reakce

## **ANNOTATION**

This diploma thesis is consisted of two parts – teoretical and experimental. First part is focused on amino acids, their structure, classification, properties, reactivity, and determination. In the end of the teoretical part, more detailed information about selected amino acid (i.e. proline, hydroxyproline, aspartic acid, and asparagine) is mentioned.

Second part is focused on conversion of selected amino acids by Van Slyke reaction, i.e. reaction of amino acid with sodium nitrite and acetic acid. Formed compounds are analysed by isotachophoresis in anionic mode. These compounds are collected during analysis using micropreparative stopcock. Their structure is subsequently verified by mass spektrometry.

## **KEYWORDS**

Amino acids, Proline, Hydroxyproline, Asparagine, Aspartic acid, Conversion, Van Slyke reaction



# OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>15</b>
<b>2.1</b>	<b>Aminokyseliny</b> .....	<b>15</b>
2.1.1	Struktura aminokyselin .....	15
2.1.2	Rozdělení aminokyselin .....	16
2.1.3	Vlastnosti aminokyselin .....	19
<b>2.2</b>	<b>Chemické reakce aminokyselin</b> .....	<b>21</b>
2.2.1	Základní reakce aminokyselin.....	21
2.2.1.1	Dekarboxylace .....	21
2.2.1.2	Transaminace.....	21
2.2.1.3	Oxidační deaminace .....	22
2.2.1.4	Esterifikace .....	22
2.2.1.5	Acylace .....	23
2.2.2	Peptidová vazba .....	23
2.2.3	Důkazové reakce .....	23
2.2.3.1	Reakce s ninhydrinem .....	24
2.2.3.2	Reakce s fluorescaminem .....	25
2.2.3.3	Chemiluminiscenční reakce.....	25
2.2.4	Derivatizační reakce .....	25
2.2.4.1	Reakce s <i>o</i> -ftalaldehydem.....	26
2.2.4.2	Reakce s dansylchloridem .....	27
2.2.4.3	Reakce s fenylisothiokyanátem .....	28
2.2.5	Formolová titrace .....	28
2.2.6	Manometrické stanovení aminokyselin dle van Slykea .....	29
2.2.6.1	Reakce prolinu s kyselinou dusitou .....	30
<b>2.3</b>	<b>Izolace bílkovin</b> .....	<b>31</b>
<b>2.4</b>	<b>Stanovení aminokyselin</b> .....	<b>32</b>

2.4.1	Spektrální metody .....	32
2.4.1.1	Spektrofotometrické stanovení aminokyselin reakcí s ninhydrinem.....	33
2.4.1.2	Spektrofotometrické stanovení kyselinou 2,4,6-trinitrobenzensulfonovou.....	33
2.4.2	Chromatografické metody .....	33
2.4.2.1	Papírová chromatografie a tenkovrstvá chromatografie.....	33
2.4.2.2	Plynová chromatografie.....	34
2.4.2.3	Kapalinová chromatografie .....	36
2.4.2.4	Automatické analyzátory aminokyselin .....	37
2.4.3	Elektromigrační metody.....	38
2.4.3.1	Elektroforetické stanovení.....	38
2.4.3.2	Izotachoforetické stanovení.....	40
2.4.4	Hmotnostní spektrometrie.....	42
<b>2.5</b>	<b>Prolin .....</b>	<b>42</b>
<b>2.6</b>	<b>Hydroxyprolin.....</b>	<b>44</b>
<b>2.7</b>	<b>Asparagin .....</b>	<b>45</b>
<b>2.8</b>	<b>Kyselina asparagová.....</b>	<b>46</b>
<b>2.9</b>	<b>Azokarmin G.....</b>	<b>47</b>
<b>3</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....</b>	<b>48</b>
<b>3.1</b>	<b>Použité chemikálie .....</b>	<b>48</b>
<b>3.2</b>	<b>Příprava roztoků .....</b>	<b>48</b>
<b>3.3</b>	<b>Příprava roztoků aminokyselin a jejich konverze.....</b>	<b>49</b>
<b>3.4</b>	<b>Elektrolytové systémy .....</b>	<b>50</b>
<b>3.5</b>	<b>Přístroje a zařízení .....</b>	<b>51</b>
3.5.1	Elektroforetický/izotachoforetický analyzátor EA 102 .....	51
3.5.1.1	Pracovní podmínky ITP analýzy .....	52
3.5.2	Mikropreparativní kohout .....	53
3.5.3	Hmotnostní spektrometr micrOTOF-Q.....	54
3.5.3.1	Pracovní podmínky hmotnostní spektrometrie.....	54

<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>55</b>
4.1	Prolin a hydroxyprolin.....	55
4.2	Asparagin a kyselina asparagová.....	62
<b>5</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>68</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURA.....</b>	<b>69</b>

## SEZNAM POUŽÍTÝCH ZKRATEK

AMP	adenosinmonofosfát
ATP	adenosintrifosfát
CE	kapilární elektroforéza
CZE	kapilární zónová elektroforéza
ESI	ionizace elektrosprejem
FPD	plamenová fotometrická detekce
GC	plynová chromatografie
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
ITP	kapilární izotachoforéza
LC	kapalinová chromatografie
LIF	fluorescence indukovaná laserem
MALDI-TOF	ionizace laserem za účasti matrice s analyzátozem doby letu
MOA	Mars Organic Analyze
MS	hmotnostní spektrometrie
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
PC	papírová chromatografie
RP	system s obrácenými fázemi
TLC	tenkovrstvá chromatografie
UV	ultrafialové
UV/VIS	ultrafialové/viditelné

## SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1: Obecný vzorec aminokyseliny .....	16
Obrázek 2: Obecný vzorec aminokyseliny ve formě amfolytu .....	20
Obrázek 3: Obecná rovnice dekarboxylace .....	21
Obrázek 4: Obecná rovnice transaminace.....	22
Obrázek 5: Obecná rovnice oxidační deaminace.....	22
Obrázek 6: Obecná rovnice esterifikace aminokyselin.....	22
Obrázek 7: Obecná rovnice acylace aminokyselin .....	23
Obrázek 8: Reakce vzniku peptidové vazby mezi dvěma aminokyselinami.....	23
Obrázek 9: Obecná rovnice reakce dvou molekul ninhydrinu s aminokyselinou .....	24
Obrázek 10: Struktura fluorescaminu .....	25
Obrázek 11: Obecná rovnice reakce o-ftalaldehydu s aminokyselinou.....	27
Obrázek 12: Obecná rovnice reakce dansylchloridu s aminokyselinou .....	27
Obrázek 13: Obecná rovnice reakce fenylisothiokyanátu s aminokyselinou .....	28
Obrázek 14: Obecná rovnice reakce formaldehydu s aminokyselinou.....	28
Obrázek 15: Obecná rovnice reakce primární aminoskupiny s kyselinou dusitou.....	29
Obrázek 16: Obecná rovnice reakce aminokyseliny s kyselinou dusitou.....	30
Obrázek 17: Rovnice reakce prolinu s kyselinou dusitou.....	31
Obrázek 18: Obecná rovnice reakce kyseliny 2,4,6-trinitrobenzensulfonové .....	33
Obrázek 19: Struktura L-prolinu.....	42
Obrázek 20: Struktura L-4-hydroxyprolinu .....	44
Obrázek 21: Struktura L-asparaginu .....	45
Obrázek 22: Struktura kyseliny L-asparagové.....	46
Obrázek 23: Struktura azokarminu G .....	47
Obrázek 24: Elektroforetický/izotachoforetický analyzátor EA 102.....	52

Obrázek 25: Mikropreparativní kohout .....	53
Obrázek 26: Polohy frakcionačního kohoutu .....	54
Obrázek 27: Reakce konverze aminokyseliny s dusitanem sodným a kyselinou.....	55
Obrázek 28: Izotachoforetické záznamy prolinu a hydroxyprolinu po konverzi .....	56
Obrázek 29: Izotachoforetický záznam směsi prolinu a hydroxyprolinu .....	56
Obrázek 30: Izotachoforetické záznamy směsi prolinu a hydroxyprolinu s barvivem.....	57
Obrázek 31: Izotachoforetická analýza azokarminu G.....	57
Obrázek 32: Schématické znázornění měření parametru.....	58
Obrázek 33: Izotachoforetický záznam azokarminu G s odběry frakcí.....	59
Obrázek 34: Odběr konvertovaného prolinu.....	59
Obrázek 35: Odběr konvertovaného hydroxyprolinu .....	60
Obrázek 36: MS spektrum konvertovaného prolinu.....	61
Obrázek 37: MS spektrum konvertovaného hydroxyprolinu.....	61
Obrázek 38: Izotachoforetický záznam kyseliny asparagové bez konverze.....	62
Obrázek 39: Izotachoforetický záznam kyseliny asparagové a asparaginu.....	63
Obrázek 40: Izotachoforetická analýza azokarminu G.....	63
Obrázek 41: Izotachoforetický záznam azokarminu G s odběry frakcí.....	64
Obrázek 42: Odběr konvertovaného asparaginu.....	65
Obrázek 43: Odběr konvertované kyseliny asparagové.....	65
Obrázek 44: MS spektrum konvertované kyseliny asparagové.....	66
Obrázek 45: MS spektrum konvertovaného asparaginu .....	67
Tabulka 1: Přehled základních 20 aminokyselin .....	16
Tabulka 2: Parametry kolony a mikropreparativního kohoutu .....	58

## 1 ÚVOD

Aminokyseliny jsou hlavními stavebními jednotkami bílkovin a peptidů, tudíž jsou důležitými složkami naší potravy. Vyskytují se buď vázané nebo jako samostatné sloučeniny (volné aminokyseliny). Některé aminokyseliny mohou být syntetizovány v těle člověka a jiné musíme přijímat v potravě (esenciální aminokyseliny). Aminokyseliny, které se vyskytují v potravě nejméně, jsou limitující a určují výživovou hodnotu potravin.

Některé aminokyseliny určují kvalitu potravin, jako je například prolin, který se vyskytuje v ovocných šťávách a medu, podle jeho množství lze poznat falšování těchto potravin. Analýza aminokyselin v tělních tekutinách jako je moč a krev může pomoci v diagnostice a léčbě různých nemocí. Kompoziční analýza aminokyselin v proteinech a peptidech je nezbytná pro studium primární struktury aminokyselin v biochemii.

Kvůli důležitosti aminokyselin, je nutné umět je kvalitativně i kvantitativně stanovit. Aminokyseliny se dají stanovit řadou metod, jako jsou spektrální metody, chromatografické metody, elektromigrační metody a v neposlední řadě také hmotnostní spektrometrie. Každá z těchto metod má své klady, ale i zápory a přinesly do analýzy aminokyselin mnoho nových poznatků.

Tato diplomová práce se zaměřuje na aminokyseliny, hlavně na jejich stanovení, a to především na konkrétní čtyři aminokyseliny, kterými jsou prolin, hydroxyprolin, asparagin a kyselina asparagová. Těmto čtyřem aminokyselinám je věnována celá experimentální část, tj. izotachoforetické měření po jejich konverzi kyselinou dusitou a zjištění, jak tyto odlišné aminokyseliny konvertují.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Aminokyseliny

Aminokyseliny jsou základní stavební jednotky peptidů a bílkovin. V přírodě bylo doposud identifikováno více než 700 aminokyselin, ale nejdůležitějších je 20 základních biogenních aminokyselin, které se v biochemii a molekulární genetice označují jako kódované.<sup>[1]</sup>

Některé aminokyseliny si člověk nedokáže syntetizovat a musí je získávat výhradně potravou. Pro tyto aminokyseliny se užívá termín esenciální aminokyseliny. Mezi esenciální se řadí: valin, leucin, isoleucin, threonin, methionin, lysin, fenylalanin a tryptofan. Pro vývoj malých dětí jsou ještě esenciálními aminokyselinami arginin a histidin. Někdy se tyto dvě nazývají také semiesenciální.<sup>[1]</sup>

Podle počtu vázaných aminokyselin se vysokomolekulární látky rozdělují na:

- Peptidy – obsahují 2 až 100 jednotek aminokyselin
  - Oligopeptidy obsahují 2 až 10 aminokyselin
  - Polypeptidy obsahují 11 až 100 aminokyselin
- Proteiny (= bílkoviny) – obsahují 101 až několik tisíc aminokyselin.

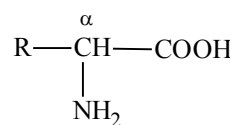
#### 2.1.1 Struktura aminokyselin

Aminokyseliny jsou organické sloučeniny, v jejichž molekule je přítomna alespoň jedna primární aminoskupina  $-NH_2$  a současně alespoň jedna karboxylová skupina  $-COOH$ . Jsou to tedy karboxylové kyseliny se substituovanou aminoskupinou.<sup>[2]</sup>

Podle vzdálenosti aminoskupiny od karboxylové skupiny se obecně rozlišují:  $\alpha$ -aminokyseliny,  $\beta$ -aminokyseliny,  $\gamma$ -aminokyseliny,  $\delta$ -aminokyseliny a  $\varepsilon$ -aminokyseliny.<sup>[2]</sup>

Základní aminokyseliny vázané ve všech bílkovinách jsou výhradně  $\alpha$ -aminokyseliny, které mají primární, případně sekundární aminoskupinu na uhlíku sousedícím s karboxylovou skupinou. Tento uhlík v poloze 2 se běžně označuje jako uhlík  $C_\alpha$  (Obrázek 1). Všechny aminokyseliny s výjimkou glycinu jsou aktivní (chirální) sloučeniny, téměř výhradně řady L.<sup>[2]</sup>





Obrázek 1: Obecný vzorec aminokyseliny

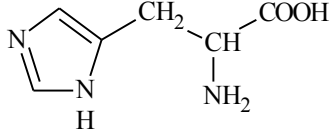
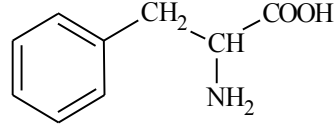
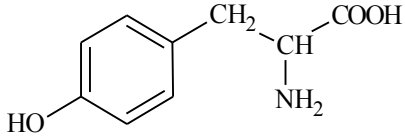
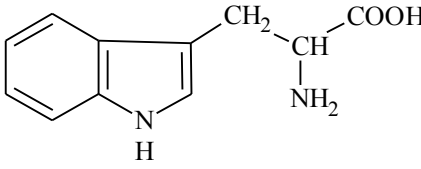
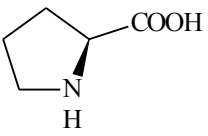
### 2.1.2 Rozdělení aminokyselin

V tabulce 1 je uveden název, zkratka a vzorec 20 základních aminokyselin.

Tabulka 1: Přehled základních 20 aminokyselin<sup>[2]</sup>

Triviální název	Zkratka	Vzorec
Glycin	Gly	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ / \\ \text{H}_2\text{C} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$
L-alanin	Ala	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ / \\ \text{H}_3\text{C}-\text{CH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$
L-valin	Val	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{H}_3\text{C}-\text{CH}-\text{CH}-\text{COOH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$
L-leucin	Leu	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \quad \text{CH}_2 \\ \diagdown \quad / \\ \text{CH} \quad \text{CH}-\text{COOH} \\   \quad   \\ \text{CH}_3 \quad \text{NH}_2 \end{array}$
L-isoleucin	Ile	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \\ \vdots \\ \text{H}_3\text{C}-\text{CH}-\text{CH}-\text{COOH} \\   \quad   \\ \text{CH}_2 \quad \text{NH}_2 \end{array}$
L-serin	Ser	$\begin{array}{c} \text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$

L-threonin	Thr	$  \begin{array}{c}  \text{HO} \\    \\  \text{H}_3\text{C}-\text{CH}-\text{CH}-\text{COOH} \\    \\  \text{NH}_2  \end{array}  $
L-cystein	Cys	$  \begin{array}{c}  \text{HS}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\    \\  \text{NH}_2  \end{array}  $
L-methionin	Met	$  \begin{array}{c}  \text{H}_3\text{C}-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\    \\  \text{NH}_2  \end{array}  $
L-asparagová kyselina	Asp	$  \begin{array}{c}  \text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\    \\  \text{NH}_2  \end{array}  $
L-glutamová kyselina	Glu	$  \begin{array}{c}  \text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\    \\  \text{NH}_2  \end{array}  $
L-asparagin	Asn	$  \begin{array}{c}  \text{H}_2\text{N}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\    \\  \text{NH}_2  \end{array}  $
L-glutamin	Gln	$  \begin{array}{c}  \text{O} \\     \\  \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\    \\  \text{NH}_2  \end{array}  $
L-lysin	Lys	$  \begin{array}{c}  \text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\    \\  \text{NH}_2  \end{array}  $
L-arginin	Arg	$  \begin{array}{c}  \text{NH} \\     \\  \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\    \\  \text{NH}_2  \end{array}  $

L-histidin	His	
L-fenylalanin	Phe	
L-tyrosin	Tyr	
L-tryptofan	Trp	
L-prolin	Pro	

Klasifikace aminokyselin podle struktury postranního řetězce:<sup>[2]</sup>

- Alifatické aminokyseliny (monoaminomonokarboxylové kyseliny) s nesubstituovaným postranním řetězcem: glycin, alanin, valin, leucin a isoleucin.
- Alifatické hydroxyaminokyseliny: serin a threonin.
- Alifatické sírné aminokyseliny: cystein a methionin.
- Aminokyseliny s karboxylovou skupinou v postranním řetězci (monoaminodikarboxylové kyseliny): kyselina asparagová a kyselina glutamová.
- Aminokyseliny a karboxamidovou skupinou v postranním řetězci: asparagin a glutamin.
- Aminokyseliny s bazickými funkčními skupinami v postranním řetězci: lysin, arginin a histidin.

- Aminokyseliny s aromatickým a heterocyklickým postranním řetězcem: fenylalanin, tyrosin a tryptofan.
- Aminokyselina, u které se funkční skupina účastní tvorby cyklu: prolin.

V biochemii je nejčastější klasifikace základní aminokyseliny bílkovin, podle polarity postranního řetězce a jeho iontové formy vyskytující se v neutrálním prostředí, na sloučeniny:<sup>[2]</sup>

- S nepolárním postranním řetězcem, hydrofobní aminokyseliny: valin, leucin, isoleucin, methionin, fenylalanin, tyrosin a prolin.
- Přejít mezi hydrofobními a hydrofilními aminokyselinami, amfifilní: glycin, alanin a tryptofan.
- S polárním postranním řetězcem, hydrofilní aminokyseliny: serin, threonin, cystein, kyselina asparagová a glutamová, asparagin, glutamin, lysin, arginin a histidin.

Hydrofilní aminokyseliny jsou podle iontové formy, ve které se vyskytují v živých organismech.<sup>[2]</sup>

- Neutrální (polární postranní řetězec nemá v neutrálním prostředí elektrický náboj): většina aminokyselin
- Kyselé (polární postranní řetězec má v neutrálním prostředí záporný náboj): kyselina asparagová a kyselina glutamová.
- Bazické (polární postranní řetězec má v neutrálním prostředí kladný náboj): lysin, arginin a histidin.

### 2.1.3 Vlastnosti aminokyselin

Důležitou vlastností aminokyselin je jejich dipolární charakter, což znamená, že se mohou chovat jako kyseliny nebo jako zásady. Proto aminokyseliny řadíme mezi látky amfoterní neboli amfolyty (Obrázek 2). Pokud je výsledný náboj nulový, je amfolyt ve formě amfionu. Hodnota pH, při kterém dostaneme amfion, se nazývá izoelektrický bod (pI). Tato důležitá charakteristika amfolytů může být vypočítána jako

aritmetický průměr hodnot  $pK_1$  a  $pK_2$ , kde  $K_1$  a  $K_2$  jsou disociační konstanty. Ty vyjadřují schopnost skupiny odštěpovat proton.<sup>[1]</sup>

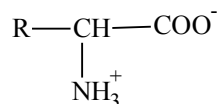
$$pI = \frac{1}{2}(pK_1 + pK_2)$$

neutrální aminokyseliny  $pI = 5,0 - 6,4$

kyselé aminokyseliny  $pI = 2,3 - 3,1$

bazické aminokyseliny  $pI = \text{nad } 7,0$

$pI$  je  $pH$ , při kterém nemá aminokyselina žádný výsledný náboj a tudíž se v elektrickém poli nepohybuje.<sup>[4]</sup>



Obrázek 2: Obecný vzorec aminokyseliny ve formě amfolytu

Díky dipolárnímu charakteru se aminokyseliny chovají spíše jako soli než jako organické látky. Rozkládají se nebo tají v rozmezí 200 až 350 °C a většinou jsou dobře rozpustné ve vodě a jen málo rozpustné v organických rozpouštědlech. Soli aminokyselin jsou ve vodném prostředí daleko lépe rozpustné než volné aminokyseliny. Jejich rozpustnost závisí na hodnotě  $pH$ , samozřejmě v izoelektrickém bodě mají aminokyseliny nejmenší rozpustnost.<sup>[1, 3]</sup>

Některé aminokyseliny jsou sensoricky aktivními látkami, a proto mohou ovlivňovat organoleptické vlastnosti potravin. Podle organoleptických vlastností se základní aminokyseliny rozlišují na:<sup>[2]</sup>

- Sladké: glycin, alanin, threonin, prolin a hydroxyprolin.
- Kyselé: asparagová a glutamová kyselina.
- Hořké: leucin, isoleucin, fenylalanin, tyrosin a tryptofan.
- Indiferentní: ostatní aminokyseliny.

Aminokyseliny neabsorbují záření ve viditelné oblasti spektra (nemají žádnou barvu) a neabsorbují ultrafialové záření o vlnové délce vyšší než 240 nm. Výjimku tvoří aromatické aminokyseliny jako je tryptofan, tyrosin, fenylalanin, ale také histidin, které mají schopnost absorbovat UV záření v oblasti 260 – 300 nm. Po fyzikální stránce tak fungují jako chromofory. Této vlastnosti se využívá při určení koncentrace peptidů a proteinů.<sup>[1, 4]</sup>

## 2.2 Chemické reakce aminokyselin

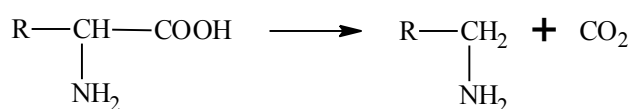
### 2.2.1 Základní reakce aminokyselin

Aminokyseliny podléhají běžným analyticky využitelným reakcím.

#### 2.2.1.1 Dekarboxylace

Postupným zahříváním aminokyseliny na teplotu 200 °C dochází k odštěpení CO<sub>2</sub> a vzniku primárního aminu. Reakce (Obrázek 3) je katalyzována kovovými ionty. Vznikající aminy mají obvykle výrazné fyziologické účinky a nazývají se proto biogenní aminy.<sup>[3, 5]</sup>

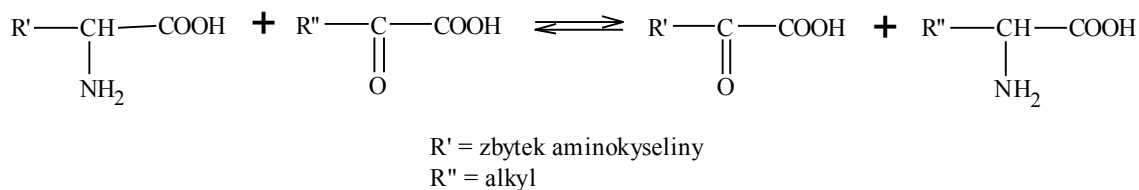
U bakterií je dekarboxylace hlavní cestou odbourávání aminokyselin a je rozšířena i u rostlin. U živočišných organismů slouží pouze k výrobě důležitých biogenních aminů, jež jsou využívány k výstavbě koenzymů, vitaminů a hormonů.<sup>[5]</sup>



Obrázek 3: Obecná rovnice dekarboxylace

#### 2.2.1.2 Transaminace

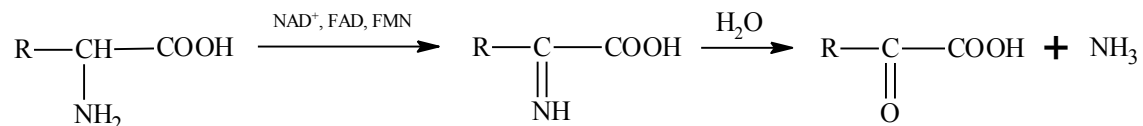
Transaminace spočívá v přenosu aminoskupiny z aminokyseliny na oxokyselinu, přičemž při výměně vzniká nová aminokyselina a nová oxokyselina. Reakce (Obrázek 4) je vratná.<sup>[3, 5]</sup>



Obrázek 4: Obecná rovnice transaminace

### 2.2.1.3 Oxidační deaminace

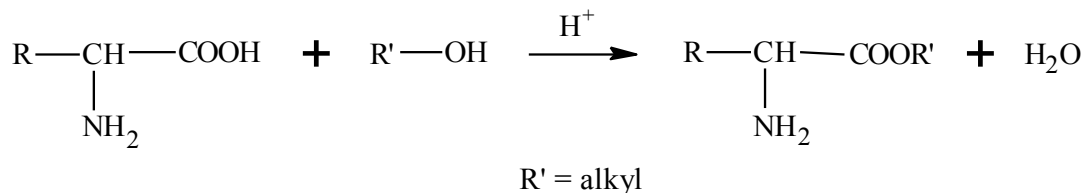
K eliminaci aminoskupin používají organismy dehydrogenaci aminokyseliny na iminokyselinu, která se hydrolyzuje na oxokyselinu za uvolnění amoniaku. Deaminace (Obrázek 5) je jedna z významných reakcí přeměny aminokyselin. Tento proces je katalyzován oxidorektázami s pyridinovými nebo flavinovými koenzymy.<sup>[3, 5]</sup>



Obrázek 5: Obecná rovnice oxidační deaminace

### 2.2.1.4 Esterifikace

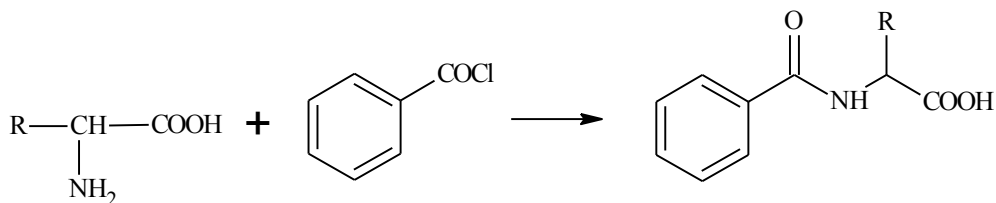
Aminokyseliny reagují s alkoholy v prostředí minerální kyseliny za vzniku esteru. Při reakci (Obrázek 6) musí být nejprve ochráněna aminoskupina a potom může být provedena esterifikace za přítomnosti silné minerální kyseliny. Vzniklé estery aminokyselin mají charakteristický zápach a jsou bezbarvé. Pomocí frakční destilace můžeme rozdělit směs esterů, což byla dříve jedna z prvních metod separace aminokyselin.<sup>[6]</sup>



Obrázek 6: Obecná rovnice esterifikace aminokyselin

### 2.2.1.5 Acylace

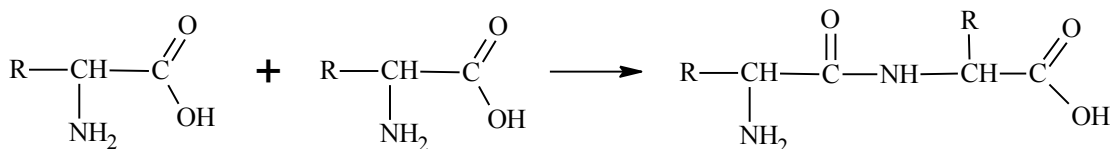
Reakce aminokyselin s deriváty karboxylových kyselin (Obrázek 7) jako jsou chloridy a anhydridy karboxylových kyselin vznikají *N*-acylamidy kyselin. Většinou to jsou produkty krystalické povahy a díky výjimečným teplotám tání se využívají k identifikaci aminokyselin.<sup>[7, 8]</sup>



Obrázek 7: Obecná rovnice acylace aminokyselin

### 2.2.2 Peptidová vazba

Nejdůležitější reakcí, které podléhá skoro 90 % aminokyselin v organismu, je tvorba peptidové vazby. Vazba vzniká mezi  $\alpha$ -aminoskupinou jedné aminokyseliny a  $\alpha$ -karboxylem aminokyseliny druhé (Obrázek 8) za odstranění jedné molekuly vody. Aby došlo k vytvoření peptidové vazby, musí být nejprve aktivována karboxylová skupina. Vazba vzniká kondenzací, při níž aminokyselina acyluje aminoskupinu následující aminokyseliny. Z chemického hlediska může tato reakce nejprve vyžadovat přeměnu na acylchlorid. Z hlediska biologického zahrnuje aktivace počáteční kondenzaci s ATP.<sup>[3, 4]</sup>



Obrázek 8: Reakce vzniku peptidové vazby mezi dvěma aminokyselinami

### 2.2.3 Důkazové reakce

Důkazové reakce slouží k prokázání aminokyseliny ve vzorku.



### 2.2.3.1 Reakce s ninhydrinem

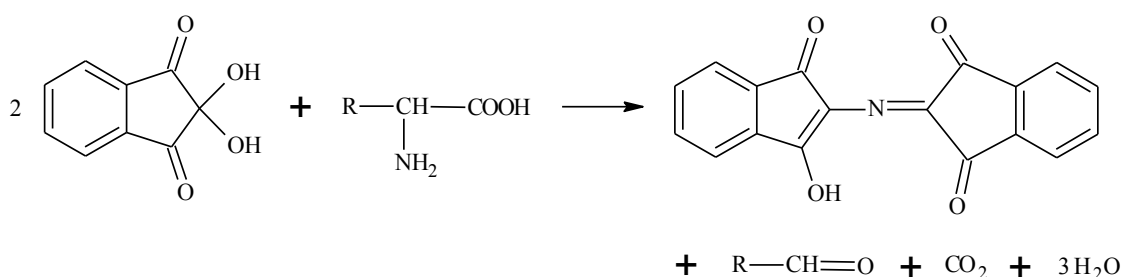
Činidlo ninhydrin se používá jako důkazové činidlo, tak i jako činidlo derivatizační. Je to jedna z nejstarších reakcí derivatizace rozdělených aminokyselin.

Dvě molekuly ninhydrinu oxidativně dekarboxylují jednu molekulu  $\alpha$ -aminokyseliny na  $\text{CO}_2$ ,  $\text{NH}_3$  a aldehyd (Obrázek 9), který je o jeden uhlík kratší než původní aminokyselina, za vzniku Ruhemannovy červeně. Redukovaný ninhydrin pak reaguje s uvolněným čpavkem a vzniká modrý komplex, který absorbuje při vlnové délce 570 nm. Toto modré zbarvení tvoří základ kvantitativního testu pro určení  $\alpha$ -aminokyselin, jímž je možné zjistit aminokyselinu v množství, které je nižší než 1  $\mu\text{g}$ . Prolin a 4-hydroxyprolin vytvářejí s ninhydrinem žluté zbarvení.<sup>[4, 9]</sup>

Detekce rozdělených solutů po derivatizaci ninhydrinem se provádí při dvou vlnových délkách: při 570 nm pro běžné aminokyseliny a při 440 nm pro aminokyseliny obsahující sekundární aminoskupinu (prolin a hydroxyprolin). Poměr absorbance při 440 a 570 nm, lze použít jako diagnostický prostředek pro identifikaci určité aminokyseliny, protože tento poměr je pro danou aminokyselinu charakteristický.<sup>[9]</sup>

Pro derivatizaci se používá roztok ninhydrinu v pufru s přídavkem methylcellosolvu. Reakce probíhá za zvýšené teploty (55 °C) po dobu 15 – 20 minut zpravidla v dusíkem segmentovaném reaktoru. Po reakci modře zbarvená směs prochází dvěma detektory, na kterých se měří absorbance při 540 a 440 nm. Mez detekce u ninhydrinové metody je kolem 100 pmol.<sup>[9]</sup>

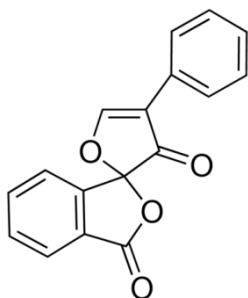
Reakce aminokyseliny s ninhydrinem se dá využít při manometrickém stanovení aminokyselin. Při reakci s ninhydrinem vzniká oxid uhličitý a poté se měří jeho objem v plynové byretě.



Obrázek 9: Obecná rovnice reakce dvou molekul ninhydrinu s aminokyselinou

### 2.2.3.2 Reakce s fluorescaminem

Fluorescamin (Obrázek 10) sám o sobě nefluoreskuje, avšak reakcí s primárními aminy dává intenzivně fluoreskující deriváty. Reakce s fluorescaminem je ve srovnání s dansylchloridem selektivnější. Stálost derivátů je však mnohem nižší. Derivatizace je třeba provádět bezprostředně před chromatografickou separací. Excitační maxima jsou kolem 390 nm a emisní maxima při 475 nm. Fluorescaminem, který je mnohem citlivějším reagenčním činidlem, je možné zjistit nanogramové množství aminokyselin.<sup>[4, 10]</sup>



Obrázek 10: Struktura fluorescaminu

### 2.2.3.3 Chemiluminiscenční reakce

Luminol (5-amino-2,3-dihydroftalazin-1,4-dion) reaguje s aminokyselinou a peroxidem vodíku v zásaditém prostředí za vzniku energeticky bohatého meziprojektu, jenž po emisi záření (nápadně modré světlo) poskytuje 3-aminoftalát. Reakce je katalyzována ionty kovů (pro aminokyseliny je nejpoužívanější  $\text{Cu}^{2+}$  pro rychlý průběh komplexotvorné reakce) a enzymy.<sup>[9, 11]</sup>

### 2.2.4 Derivatizační reakce

Derivatizační reakce jsou reakce, které se využívají při izolaci, separaci a detekci aminokyselin a jiných produktů v analytické chemii.<sup>[10]</sup>

Derivatizace, tj. zavedení vhodných atomů či funkčních skupin do molekuly původní látky (převedení původní látky na látku jinou s odlišnými vlastnostmi), se používá ke zlepšení, usnadnění či umožnění stanovení či důkazu.<sup>[10]</sup>

Derivatizační techniky umožní předseparaci či separaci, zvýší citlivost a selektivitu detekce, usnadní identifikaci. Nejvíce se derivatizačních reakcí využívá

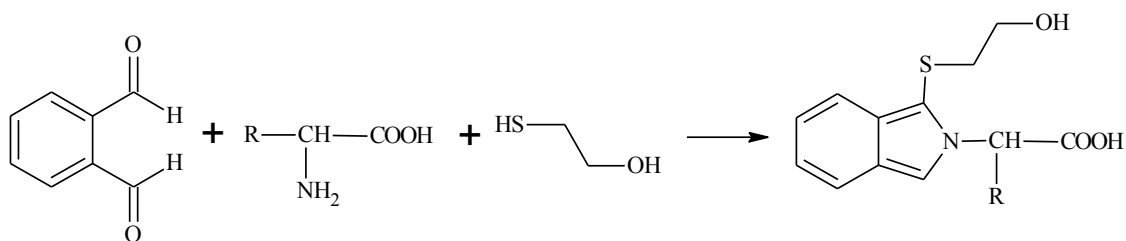
při plynové chromatografii kvůli zvýšení těkavosti analyzovaných látek, zamezení nežádoucí separace a zlepšení selektivity, zvýšení citlivosti a snížení meze detekce. V kapalinové chromatografii se připravují deriváty vykazující silnou fluorescenci nebo absorpci v ultrafialové a viditelné oblasti spektra.<sup>[10]</sup>

Existuje několik možností derivatizace – předkolonová, kolonová a „post“ kolonová. Při předkolonové derivatizaci dojde k reakci před vstupem vzorku na chromatografickou kolonu, a to buď mimo chromatografický systém nebo v reaktoru umístěném těsně před kolonou. Při kolonové derivatizaci reakce probíhá přímo v chromatografické koloně. Další možností je reakce „post“ kolonová, k níž dochází po rozdělení látek, avšak ještě před vstupem do detektoru.<sup>[9, 10]</sup>

#### 2.2.4.1 Reakce s *o*-ftalaldehydem

Nejrozšířenějším derivatizačním postupem pro aminokyseliny je reakce (Obrázek 11) s *o*-ftalaldehydem, poskytující fluoreskující deriváty. Sám *o*-ftalaldehyd nefluoreskuje. *o*-ftalaldehyd nereaguje se sekundární aminoskupinou a nelze jej použít pro stanovení některých aminokyselin, jako jsou prolin a hydroxyprolin. Aminokyseliny a peptidy poskytují s *o*-ftalaldehydem za přítomnosti merkaptoethanolu deriváty s dobrými vlastnostmi. Reakce se více aplikuje v „post-kolonové“ derivatizaci. Deriváty nejsou rovněž dostatečně stabilní, může u nich docházet k různým přesmykům. To je jeden z hlavních důvodů použití v „post-kolonové“ derivatizaci, kdy vedlejší produkty reakce neruší vlastní detekci.<sup>[9, 10]</sup>

Je-li derivatizace *o*-ftalaldehydem prováděna za kolonou, separují se analyzované aminokyseliny na katexových kolonách, obdobných těm, které se používají po ninhydrinové derivatizaci. Derivatizační reakce se provádí v reakční spirále (20 cm), při průtoku 0,5 ml/min, při teplotě 55 – 68 °C. Provádí-li se derivatizační reakce před separační kolonou, dělí se výsledné produkty aminokyselin na obrácených fázích, nejčastěji C<sub>18</sub>-silikagelu s gradientem pufr – acetonitril. Možná je i separace kapilární elektroforézou. Nevýhodou předkolonové derivatizace je nestálost vznikajících produktů. Stabilitu produktů lze zvýšit snížením hodnoty pH z 9,5 na 7,2 a vnesením derivatizovaných aminokyselin okamžitě na kolonu, nejlépe v automatizovaném on-line systému. Předkolonová derivatizace sekundárních aminokyselin se provádí za přítomnosti chloraminu T, kterým se oxiduje sekundární aminoskupina.<sup>[9, 10]</sup>



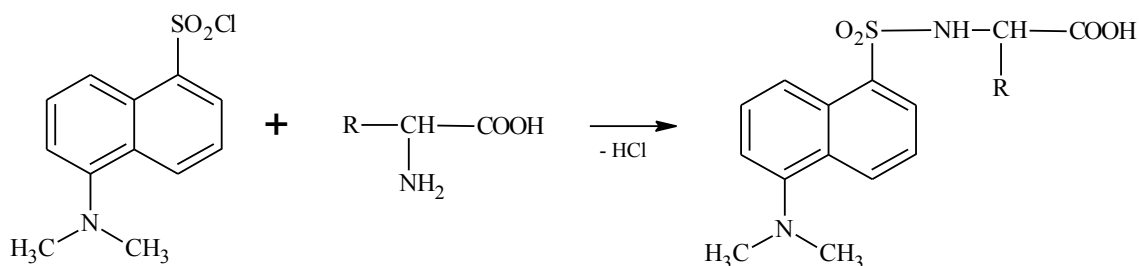
Obrázek 11: Obecná rovnice reakce o-ftalaldehydu s aminokyselinou

#### 2.2.4.2 Reakce s dansylchloridem

Dansylchlorid (5-dimethylaminonaftalen-1-sulfochlorid) je jedním z nejstarších a nejběžnějších derivatizačních činidel pro aminy, aminokyseliny a peptidy. Excitační maxima se pohybují v rozmezí 350 – 370 nm a emisní maxima v rozmezí 490 – 530 nm.<sup>[9, 10]</sup>

Reakce (Obrázek 12) probíhá v alkalickém acetonu a výsledné produkty fluoreskují. Nevýhodou reakce je tvorba dvou kontaminantů a to dansylsulfonové kyseliny (produkt hydrolyzy) a dansylamidu (produkt reakce s amoniakem).<sup>[9, 10]</sup>

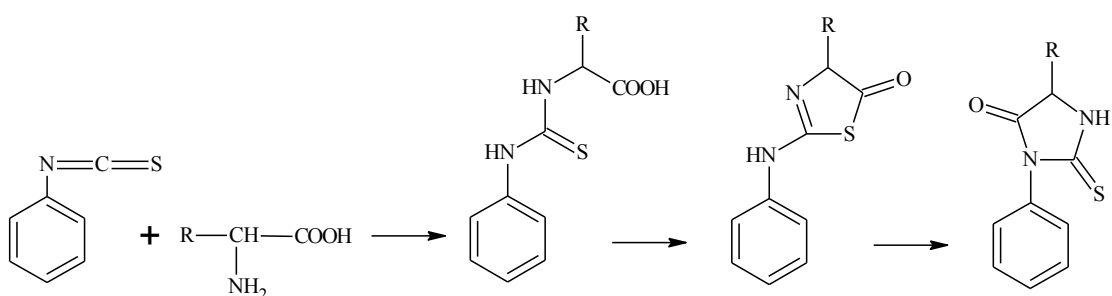
Dansylchlorid poskytuje při předkolonové derivatizaci volné primární aminoskupiny fluoreskující sulfonamidy. Nevýhodou je, že činidlo samo fluoreskuje a navíc podléhá hydrolyze za vzniku fluorescenčně aktivních hydrolytických produktů. U přirozených vzorků, obsahující volný amoniak, je ve směsi přítomen ještě dansylamid. Vzniklé deriváty se nejčastěji dělí v systému obrácených fází, ale i kapilární elektroforézou.<sup>[9, 10]</sup>



Obrázek 12: Obecná rovnice reakce dansylchloridu s aminokyselinou

### 2.2.4.3 Reakce s fenylisothiokyanátem

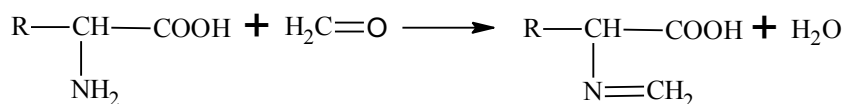
Stanovení aminokyselin reakcí (Obrázek 13) s fenylisothiokyanátem, který je široce používané činidlo, je odvozeno od Edmanovy degradace bílkovin. Derivatizace se provádí před kolonou a vzniklé fenylthiohydantoiny je možno dále konvertovat na fenylthiokarbamylové deriváty zvýšením pH. Separace výsledných produktů se provádí na obrácených fázích (C<sub>18</sub>) nebo zónovou kapilární elektroforézou, eventuálně micelární elektrokinetickou chromatografií. Dělení v systému s obrácenými fázemi je buď izokratické nebo lépe s gradientem acetonitril-pufr a UV detekce se provádí při 254 nm. Doba dělení je asi 20 minut.<sup>[9]</sup>



Obrázek 13: Obecná rovnice reakce fenylisothiokyanátu s aminokyselinou

### 2.2.5 Formolová titrace

Jednou z metod kvantitativního stanovení aminokyselin je tzv. formolová titrace (Obrázek 14) podle Sørensen. Aminokyseliny se nedají vzhledem k amfoternímu charakteru titrovat přímo. Teprve po zablokování zásadité aminoskupiny formaldehydem za vzniku Schiffovy báze lze karbonylovou skupinu titrovat alkalimetry. Po reakci aminokyseliny s formaldehydem se uplatní kyselý charakter karboxylu a kyseliny je možné titrovat odměrným roztokem hydroxidu na fenolftalein.<sup>[12, 13, 14]</sup>

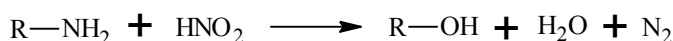


Obrázek 14: Obecná rovnice reakce formaldehydu s aminokyselinou

Metoda je vhodná pro stanovení celkového množství  $\alpha$ -aminodusíku. Stanovení ruší amoniak, který se musí z analyzovaného vzorku odstranit, jelikož s formaldehydem reaguje za vzniku hexamethylentetraminu. U barevných roztoků je nutné použít potenciometrické indikace.<sup>[12]</sup>

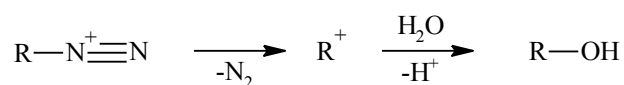
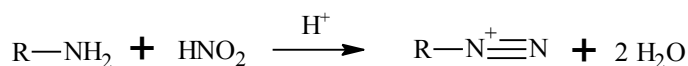
## 2.2.6 Manometrické stanovení aminokyselin dle van Slykea

V roce 1910 představil manometrickou metodu pro kvantitativní stanovení aminokyselin s primární aminoskupinou (Obrázek 15) v hydrolyzátech proteinů a potravin Donald D. Van Slyke. Kyselina dusitá konvertuje  $\alpha$ -aminokyseliny na  $\alpha$ -hydroxykyseliny, uvolňuje se ekvimolární množství dusíku, kyselé produkty rozkladu  $\text{HNO}_2$  se absorbují v roztoku hydroxidu a množství dusíku se určí z nárůstu tlaku.<sup>[14, 15, 16]</sup>



Obrázek 15: Obecná rovnice reakce primární aminoskupiny s kyselinou dusitou

Primární aminy poskytují s kyselinou dusitou diazoniový iont, který je velmi nestálý a dále se rozkládá za vývoje dusíku a karbokationtu. Kationt je reaktivní a reaguje s vodou za vzniku alkoholu.<sup>[17]</sup>

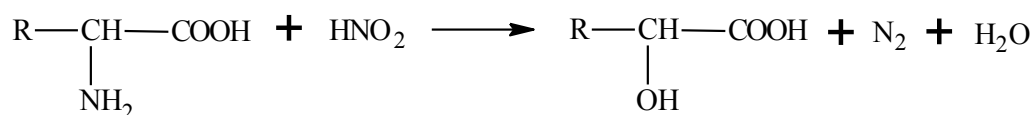


Z 1 molu primárního aminu vzniká 1 mol dusíku. Sekundární a terciární aminy nevyvíjejí žádný dusík. Ke stanovení slouží speciální aparatura. Reakce se provádí za laboratorní teploty v reakční nádobce za mechanického třepání. Kyselina dusitá se připravuje z dusitanu sodného a ledové kyseliny octové. Vytvořenými oxidy dusíku se vypudí z aparatury vzduch. Oxidy dusíku se pohltní v Hempelově pipetě s alkalickým roztokem manganistanu a zbylý dusík se měří v plynové byretě. Prolin a hydroxyprolin neodštěpují žádný dusík, jelikož obsahují pouze sekundární aminoskupinu.<sup>[17]</sup>

Vzorek je zpracován v glycerolu s dusitanem sodným a kyselinou octovou a probíhá měření objemu plynného dusíku, který je generován. Tato reakce se obvykle provádí po dobu 30 minut, během kterých se okyselí dusitan sodný kyselinou octovou na kyselinu dusitou, která reaguje s primární aminoskupinou aminokyseliny za tvorby diazotované soli, nadbytek kyseliny dusité se rozkládá na vodu a oxidy dusíku.<sup>[16]</sup>

Pro rozložení aminu jsou nejvhodnějšími podmínkami velký přebytek dusitanu, ze kterého se uvolňuje kyselina dusitá ekvivalentem slabou kyselinou (kyselina octová). Velký přebytek činidla způsobuje urychlení reakce. Použití slabé kyseliny místo minerálních kyselin použitých v předchozích metodách způsobuje vývoj relativně malého objemu oxidu dusnatého a zabraňuje nebezpečí kyselé hydrolyzy složitějších proteolytických produktů.<sup>[15]</sup>

Tato metoda je užitečná pro odhad množství aminového dusíku v neznámých látkách a ve směsích jako je hydrolyzovaný protein.<sup>[14]</sup>

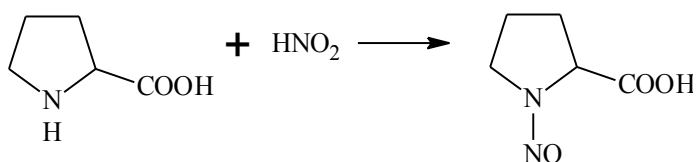


Obrázek 16: Obecná rovnice reakce aminokyseliny s kyselinou dusitou za vzniku příslušné hydroxykyseliny

#### 2.2.6.1 Reakce prolinu s kyselinou dusitou

Prolin jako jediný z 20 základních aminokyselin nemá na  $\alpha$ -uhlíku primární amin, ale sekundární amin, který je součástí pyrrolidinového kruhu. Tudiž reaguje s kyselinou dusitou jinak než se předpokládá u zbývajících základních aminokyselin. Primární aminy reagují s kyselinou dusitou za vzniku příslušné hydroxysloučeniny, sekundární aminy reagují s kyselinou za vzniku *N*-nitrosaminů (Obrázek 17), které mohou být relativně nestálé a mohou dále reagovat. Reakce prolinu s kyselinou dusitou poskytuje minimálně dva produkty. Důkazem je poskytnutí dvou oddělených zón při ITP stanovení aniontovým modem.<sup>[17, 18]</sup>

Obdobným způsobem reaguje i hydroxyprolin při manometrickém stanovení.



Obrázek 17: Rovnice reakce prolinu s kyselinou dusitou

### 2.3 Izolace bílkovin

Volné aminokyseliny nacházíme v biologickém materiálu běžně jen v malé koncentraci. Většina jich je v živých objektech vázána v bílkovinách. Při přípravě určité aminokyseliny vycházíme z bílkoviny bohaté na aminokyselinu, kterou chceme izolovat. Nejčastěji se izolují aminokyseliny z bílkovinných hydrolyzátů nebo ze směsí volných aminokyselin obsažených v různých mimobuněčných tekutinách.<sup>[5]</sup>

Podstatou hydrolýzy bílkovin je štěpení peptidových vazeb, kterými jsou v bílkovinách vzájemně vázány aminokyseliny. Bílkovinný hydrolyzát můžeme získat „kyselou“, „alkalickou“ nebo enzymovou hydrolýzou.<sup>[5, 12]</sup>

„Kyselá“ hydrolýza se provádí za varu při 110 °C po dobu 18 – 24 hodin s kyselinou chlorovodíkovou, která se z hydrolyzátu nakonec oddestiluje. Nevýhodou kyselé hydrolýzy je, že se při ní zničí tryptofan a že za přítomnosti cukerných složek vznikají z produktů jeho odbourání huminové látky. Aby se zabránilo jejich vzniku, provádí se kyselá hydrolýza za přítomnosti kovového cínu nebo kyseliny mravenčí.<sup>[5, 12, 19]</sup>

V dnešní době se provádí rychlejší kyselá hydrolýza pomocí 6 M HCl při 150 °C v zatavených ampulích za 1 hodinu oproti metodě, která využívá 6 M HCl při 110 °C v zatavených ampulích po dobu 20 – 24 hodin.<sup>[20]</sup>

Při „alkalické“ hydrolýze se bílkoviny nejčastěji vaří pod zpětným chladičem s hydroxidem barnatým nebo hydroxidem sodným. Alkalická hydrolýza je vhodná pro stanovení aminokyselin nestálých v podmínkách kyselé hydrolýzy (tryptofan). Hydroxid sodný se neutralizuje kyselinou octovou a hydroxid barnatý kyselinou sírovou. Alkalická hydrolýza se používá málo, neboť se při ní rozkládají sirné aminokyseliny, hydroxyaminokyseliny a arginin. V alkalickém prostředí dochází za varu také k racemizaci aminokyselin. Při „kyselé“ i „alkalické“ hydrolýze se rovněž deamiduje glutamin a asparagin.<sup>[5, 12]</sup>



Enzymová hydrolyza bílkovin je nejšetrnější způsob štěpení peptidových vazeb, protože při ní nedochází k destrukci uvolňovaných aminokyselin. Jednotlivé proteolytické enzymy štěpí specificky jen určité peptidové vazby, takže za použití jednoho enzymu nelze bílkovinu úplně hydrolyticky degradovat až na volné aminokyseliny. Je proto třeba používat směs proteolytických enzymů.<sup>[5]</sup>

## 2.4 Stanovení aminokyselin

K orientačnímu stanovení aminokyselin v potravinářských materiálech, resp. v hydrolyzátech bez předchozího chromatografického dělení lze použít jednak obecných metod, kterými lze získat informace o celkovém obsahu aminokyselin a jednak metod, jimiž je možné stanovit jednotlivé aminokyseliny.<sup>[12]</sup>

K prvnímu skupině patří metoda stanovení aminokyselin formolovou titrací podle Sørensen, volumetrická metoda podle van Slykea a spektrofotometrická metoda stanovení veškerých aminokyselin po reakci s ninhydrinem nebo kyselinou 2,4,6-trinitrobenzensulfonovou. V druhé skupině našla největší uplatnění spektrofotometrická metoda stanovení aminokyselin s ninhydrinem po jejich rozdělení na ionexech, stanovení po rozdělení v plošném uspořádání a plynová chromatografie.<sup>[12]</sup>

Analýzu aminokyselin lze provádět na úrovni fmol metodami za použití fluorescence detekce, zatímco u derivátů detekovaných fotometricky je analýza na úrovni pmol.<sup>[20]</sup>

### 2.4.1 Spektrální metody

Pomocí spektrálních metod lze stanovit pouze celkové množství aminokyselin, kdy se využívá reakce s ninhydrinem a reakce s kyselinou 2,4,6-trinitrobenzensulfonovou.<sup>[12]</sup>

Deriváty aminokyselin, které absorbují záření v určité části UV/VIS spektra se využívají k detekci po jejich separaci pomocí chromatografických či elektroforetických metod.<sup>[9]</sup>

#### 2.4.1.1 Spektrofotometrické stanovení aminokyselin reakcí s ninhydrinem

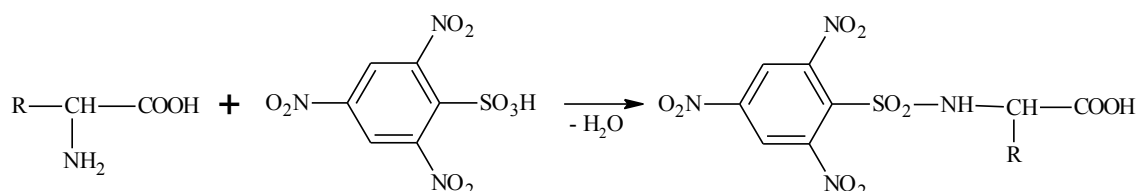
Aminokyseliny s volnou aminoskupinou poskytují s ninhydrinem kondenzační produkty modře až fialově zbarvené, různého odstínu i intenzity. Výjimku tvoří prolin a hydroxyprolin, které poskytují žluté produkty. Absorbance je měřena při 570 nm pro všechny aminokyseliny kromě prolinu a hydroxyprolinu, kdy se je použita vlnová délka 440 nm.<sup>[9, 12]</sup>

Metoda je vhodná pro stanovení celkového obsahu aminokyselin, ale i pro stanovení jednotlivých aminokyselin po předchozím chromatografickém nebo elektroforetickém rozdělení.<sup>[12]</sup>

#### 2.4.1.2 Spektrofotometrické stanovení aminokyselin kyselinou 2,4,6-trinitrobenzensulfonovou

V alkalickém prostředí vzniká reakcí kyseliny 2,4,6-trinitrobenzensulfonové s aminokyselinami (Obrázek 18) Meisenheimerův komplex žluté barvy, jehož absorbance je spektrofotometricky proměřena při 340 nm.<sup>[12]</sup>

Metoda je vhodná pro stanovení celkového obsahu aminokyselin nebo pro stanovení jednotlivých aminokyselin po předchozím chromatografickém rozdělení, kdy amonné soli a prolin nereagují.<sup>[12]</sup>



Obrázek 18: Obecná rovnice reakce kyseliny 2,4,6-trinitrobenzensulfonové s aminokyselinou

#### 2.4.2 Chromatografické metody

##### 2.4.2.1 Papírová chromatografie a tenkovrstvá chromatografie

Chromatografie na papíře (PC) je rozdělovací chromatografie, při které je stacionární fáze fixována na inertním celulosovém nosiči. Výhody jsou jednoduchá manipulace, příprava stacionární fáze a dobrá reprodukovatelnost výsledků. Nevýhodou

je zdlouhavost, malá kapacita, obtížnější izolace látek po rozdělení a nemožnost použití některých detekčních činidel.<sup>[12]</sup>

Nejpoužívanější dvoudimenzionální soustavou mobilní fáze je směs fenol/voda v poměru 8 : 2, ale využívá se i mnoho jiných látek, které mohou lépe či hůře sloužit jako mobilní fáze. Jako detekční činidlo se nejčastěji využívá roztok ninhydrinu, kterým je papír po separaci postříkán.<sup>[12]</sup>

Chromatografie na tenké vrstvě (TLC) umožňuje použít větší množství stacionární fáze než u PC, také dochází k menšímu rozpíjení nanášených skvrn. Jako stacionární fáze se nejčastěji používá silikagel, celulóza, alumina a biogely. Na ploše 10x10 cm je možné separovat až 60 sloučenin.<sup>[12]</sup>

Papírová chromatografie a tenkovrstvá chromatografie se používá pro rychlé určení, eventuálně pro semikvantitativní stanovení. Tyto dvě metody byly v dnešní době úplně nahrazeny plynovou a kapalinovou chromatografií.<sup>[12]</sup>

#### 2.4.2.2 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie (GC) je široce využívána pro analýzu aminokyselin kvůli svým vysokým rozlišovacím schopnostem, vysoké citlivosti, jednoduchosti a nízkým nákladům. Hlavním problémem plynové chromatografie je nutnost derivatizovat aminokyseliny na méně polární, ale dostatečně těkavé a stabilní sloučeniny.<sup>[9, 12, 21]</sup>

Aminokyseliny lze plynovou chromatografií stanovovat ve formě esterů, hlavně *n*-butyl a *n*-amylesterů nebo esterů *N*-acetylaminoaminokyselin, kdy je dosaženo nejlepšího dělení. Dalšími těkavými deriváty jsou *N*-trifluoroacetylestery aminokyselin, především *N*-trifluoroacetyl-*n*-butylestery. V této formě a ve formě *N*-heptafluoroesterů lze dělit všechny aminokyseliny přítomné v bílkovinných hydrolyzátech.<sup>[12]</sup>

Nejčastěji se v GC jako deriváty používají *N*-perfluoroacylalkylestery, které zahrnují *N*-trifluoroacetylmethylestery, *N*-trifluoroacetyl-*n*-propylestery, *N*-trifluoroacetylbutylestery, *N*-pentafluoropropionylisopropylestery, *N*-heptafluorbutyrylisobutylestery a *N*-pentafluorbenzoylisobutylestery. Tyto estery byly hodně studovány a některé z nich byly úspěšně využívány ke kvantifikaci aminokyselin v biologických vzorcích. Některé z těchto sloučenin mají speciální

požadavky na derivatizační postupy, jako je bezvodé prostředí, vysoká reakční teplota a degradace amidů u glutaminu a asparaginu způsobená katalyzátorem HCl.<sup>[21]</sup>

Dalším typem derivatizace aminokyselin pro GC stanovení je tzv. silylace, což znamená převedení na trimethylsilylestery N-trimethylsilylaminokyselin, připravené reakcí s trimethylchlorsilanem a hexamethyldisilasanem. Tato derivatizace je jednostupňová a je možné ji provádět i za laboratorní teploty. Jednou z nevýhod je, že 17 aminokyselin reaguje za několik desítek minut při zvýšené teplotě, glycin, arginin a glutamin zreagují až po 2,5 hodinách.<sup>[9, 12, 21]</sup>

Plynové chromatografie je přímo použitelná pro stanovení aminokyselin ve vodných roztocích nebo v kyselých hydrolyzátech čistých bílkovin. Volné aminokyseliny přítomné v některých biologických materiálech a bílkovinné hydrolyzáty těchto materiálů se před analýzou přečistí chromatograficky na sloupcích ionexů.<sup>[12]</sup>

Byla provedena separace a stanovení *o*-fosfoaminokyselin chromatografií na tenké vrstvě, gelovou elektroforézou, analyzátozem aminokyselin, vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC), kapilární zónovou elektroforézou (CZE) a imunitestem. Většina těchto metod však vyžaduje značení <sup>32</sup>P pro detekci a kvantifikaci *o*-fosfoaminokyselin a proto nemůže být použita pro analýzu neznačených *o*-fosfoaminokyselin v biologických vzorcích. Navíc některé z nich vykazují špatné rozlišení nebo nízkou citlivost. Metody HPLC založené na předkolonové ultrafialové derivatizaci s fenylisothiokyanátem, dabsylchloridem a *N*-(2,4-dinitro-5fluorfenyl)-l-alaninamidem, popř. předkolonové fluorescenční derivatizaci s 9-fluorenylmethylchlorformiátem a CZE metody založené na UV derivatizaci pomocí fenylisothiokyanátu nebo dabsylchloridu byly vysoce citlivé, ale některé z těchto metod postrádají specifickou. Navíc mnohé z těchto metod vyžadují dlouhou separační dobu a vyčištění vzorku za účelem odstranění přebytečného činidla a koexistujících látek. Pro měření endogenně fosforylovaných aminokyselin byly použity i imunitesty protilátek proti každé *o*-fosfoaminokyselině, ale tyto metody zahrnují některé problémy ve specifitě a crossreaktivitě protilátek.<sup>[22]</sup>

V nedávné době byla vyvinula selektivní a citlivá metoda pro určení *o*-fosfoaminokyselin pomocí plynové chromatografie s plamenovou fotometrickou detekcí (FPD) za použití kapilární kolony, ve které jsou tyto sloučeniny analyzovány jako jejich *N*-isobutoxykarbonylmethylester deriváty. Použitím této metody byl prokázán obsah volných *o*-fosfoaminokyselin v tkáních a moči. Derivatizaci

na *N*-isobutoxykarbonylmethylestery *o*-fosfoaminokyselin lze snadno, rychle a kvantitativně provést reakci s isobutylchlorformiátem protřepáním ve vodném alkalickém prostředí a následnou esterifikací diazomethanem. *o*-fosfoaminokyseliny v peptidech nebo proteinech byly uvolněny ze vzorku kyselou a alkalickou hydrolyzou před derivatizací. Hlavní výhodou této metody je to, že tyto aminokyseliny mohou být snadno přeměněny ve vodném prostředí bez jakéhokoli dalšího čištění a jejich deriváty jsou stabilní vůči vlhkosti. Kromě toho mohou být deriváty kvantitativně a reprodukovatelně rozděleny do 20 minut za použití kapilární kolony a poskytují vynikající odezvu FPD.<sup>[22]</sup>

#### 2.4.2.3 Kapalinová chromatografie

V dnešní době se ke stanovení aminokyselin nejvíce využívá vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Aminokyseliny neabsorbují UV záření, tudíž je nutné je derivatizovat, aby mohla být umožněna UV nebo fluorescenční detekce. Nejvíce se využívá postkolonová derivatizace, před níž musí být jednotlivé aminokyseliny separovány na iontově-výměnné koloně. Nejčastěji využívaná derivatizační činidla jsou ninhydrin, fluorescamin a *o*-ftalaldehyd. Postkolonová derivatizace je přesnější, jelikož nemusí být manipulováno s deriváty, které mají omezenou stabilitu, ale potřebuje dlouhý čas analýzy a má vysoké provozní náklady. Předkolonová derivatizace probíhá před samotnou separací nejčastěji pomocí autosampleru před nástřikem do chromatografu. Předkolonová derivatizace je dostupnější a levnější metoda. Při tomto typu derivatizace se nejčastěji jako derivatizační činidlo využívá fenylisothiokyanát, *o*-ftalaldehyd, dansylchlorid a 9-fluorenylmethylchlorformiát, přičemž každé činidlo má své konkrétní výhody a omezení.<sup>[9, 20, 23, 24, 25]</sup>

Předkolonová derivatizace pomocí činidla fenylisothiokyanátu probíhá za laboratorní teploty po dobu 5 až 10 minut. Dále se fenylthiokarbamylové deriváty rozpustí v octanu amonném při pH 6,8 a použije se kolona s oktyl- nebo oktadecylsilylovou fází. Detekce je při 254 nm a eluce všech fenylthiokarbamylových aminokyselin proběhne do 30 minut za použití gradientu mobilní fáze, kterou tvoří octanu amonný a acetonitril nebo methanol.<sup>[26]</sup>

Při použití fluorescenčních detektorů můžeme stanovovat aminokyseliny až o koncentracích pmol/l. Vzorky bílkovin jsou nejprve kyselě hydrolyzovány, poté probíhá automatická derivatizace o-ftalaldehydem a dále in-line analýza pomocí HPLC-RP s detekcí UV/VIS zářením.<sup>[23]</sup>

Jednou z možných analýz aminokyselin je použití vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC-MS). Bohužel nejsou stanoveny vhodné podmínky analýzy pro volné aminokyseliny, většina metod LC-MS byla vyvinuta pro derivatizované aminokyseliny.<sup>[25]</sup>

Aminokyseliny jsou užitečné markery pro definování pravosti ovocných šťáv a jejich použití je komplikováno přirozenou variabilitou ovoce. Především prolin je v rámci evropských regulačních hodnot zahrnut do testování pravosti ovocných šťáv a nektarů.<sup>[24]</sup>

V ovocných šťávách se aminokyseliny stanovují pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s obrácenými fázemi, jelikož je to jednoduchá, rychlá a spolehlivá metoda, kdy se stanoví až 16 aminokyselin. Tato metoda nevyžaduje čištění vzorku, pouze se upraví hodnota pH na alkalickou (pH 8,5) za použití boritanového pufru a poté se aminokyselina převede na stabilní derivát za použití 9-fluorenylmethylchlorformiátu. Přebytek derivatizačního činidla se odstraní aminem 1-aminoadamantan-hydrochloridem. Postup derivatizace je jednoduchý a rychlý, přičemž se nejvíce využívá předkolumnové derivatizace pro její jednoduchou instrumentaci, nízké náklady a krátkou dobu derivatizace. Aminokyseliny jsou detekovány při 263 nm a eluovány během 35 minut.<sup>[24]</sup>

#### 2.4.2.4 Automatické analyzátory aminokyselin

Automatické analyzátory aminokyselin pracují na principu vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Aminokyseliny se nejprve rozdělí na sloupci silně kyselého katexu elucí citranovými pufrů o pH 3,25 a 4,25, bazické aminokyseliny se rozdělí na sloupci téhož ionexu elucí citranovým pufrům o pH 5,28. Dělení aminokyselin na katexu kyselými pufrů s přerušovaným gradientem pH probíhá v nederivatizované formě. Po separaci probíhá postkolumnová derivatizace ninhydrinem za zvýšené teploty (55 °C). Nakonec projde směs dvěma fotometrickými detektory, pomocí nichž se měří absorbance při 440 a 540 nm. Mez detekce této metody je 100 pmol. Metoda má

univerzální použití, je vhodná pro dělení směsí volných aminokyselin i pro všechny druhy bílkovin a peptidů.<sup>[9, 12]</sup>

### 2.4.3 Elektromigrační metody

#### 2.4.3.1 Elektroforetické stanovení

Kapilární elektroforéza (CE) je široce používána ke studiu aminokyselin. Tato technika má několik výhod, jako je rychlá analýza, vysoká selektivita, vysoká citlivost, malá spotřeba vzorku a aplikace na velké množství vzorků pro rutinní aplikace. Nejčastěji se aminokyseliny analyzují kapilární elektroforézou pomocí UV detekce a fluorescence indukované laserem (LIF).<sup>[27]</sup>

Kapilární elektroforéza je prováděna s předkolonovou, postkolonovou a kolonovou derivatizací UV chromoforovými nebo fluoroforovými činidly, aby bylo dosaženo lepšího rozlišení a citlivosti. Nejčastěji se jako derivatizační činidlo používá dansylchlorid, *o*-ftalaldehyd, fenylisothiokyanát a 9-fluorenylmethylchlorformiát.<sup>[25, 28]</sup>

Při derivatizaci aminokyselin dochází často během detekce k interferencím s píky reagentů, nebo vznikají vícečetné derivatizační produkty. Proto byla vyvinuta metoda kapilární elektroforézy s nepřímou UV detekcí pro analýzu nederivatizovaných aminokyselin. Při této metodě jsou do nosného elektrolytu přidávány látky, které absorbují v UV oblasti. Detektorem prochází nosný elektrolyt, který dává stálý signál a po průchodu aminokyseliny signál klesne. Metoda je jednoduchá, ale má menší citlivost a selektivitu.<sup>[25]</sup>

Nejvíce se derivatizace provádí on-line, aby byla příprava vzorků co nejjednodušší. Při on-line derivatizaci se používá 1,2-naftochinon-4-sulfonát jako derivatizační činidlo a absorbance se zaznamenává při 230 nm. Nejčastěji se tato metoda používá při analýze aminokyselin v krmivech a farmaceutických přípravcích.<sup>[29]</sup>

V CE lze použít i elektrochemický detektor s pomocnou pracovní elektrodou modifikovanou uhlíkovými nanotrubicemi. Elektrokatalytická detekce je zvýšena a snížil se i provozní potenciál, navíc se snížilo znečištění povrchu elektrody. Metoda se využívá ke stanovení hydrazinu, fenolu, purinu a aminokyselin, hlavně tyrosinu.<sup>[30]</sup>

Efektivní mobilita kationtových forem aminokyselin byla stanovena pomocí CZE s dvojitým bezkontaktním vodivostním detektorem za použití kyselého elektrolytu při pH 2,0 – 3,0.<sup>[30]</sup>

Spektroskopii termálních čoček (druh fototermální spektroskopie) lze využít k vysoce citlivé detekci. Lze ji provádět pod mikroskopem a je citlivější při aplikaci na vodorovný povrch, což je obtížné použít v kombinaci s kapilárou kvůli jejímu zakřivenému povrchu. Z tohoto důvodu byl pro spolehlivé měření vyvinut čip rozhraní, který je na konci separační kapiláry. Touto metodou byla zkoumána a optimalizována derivatizace dabsylchloridu s aminokyselinami (glycin, alanin, prolin a methionin).<sup>[30]</sup>

Stále více se pro detekci používá elektrochemiluminiscenční detektor, a to hlavně při kvantitativním stanovení aminokyselin v moči, převážně prolinu a kyseliny piperidové za použití tris(2,2'-bipyridine)ruthenia(II).<sup>[31]</sup>

Jedním z nejpozoruhodnějších použití CE-LIF je vývoj systému Mars Organic Analyzer (MOA), což je nástroj CE pro analýzu citlivých biomarkerů aminokyselin. MOA byl poprvé použit k analýze půdních výtěžků z Chile a pouště Atacama detekující aminokyseliny v rozmezí koncentrací 10 až 600 ppb. V minerálu jarosit, který je bohatý na sírany a souvisí s tekutou vodou, která byla zjištěna na Marsu, byly detekovány aminokyseliny od 70 ppt do 100 ppb.<sup>[30]</sup>

Spojení kapilární elektroforézy, která zajišťuje rychlou analýzu, a hmotnostní spektrometrie, která poskytuje vysokou selektivitu a citlivost, je výhodné pro stanovení aminokyselin (CE-MS). Režim ionizace elektrosprejem (ESI) je citlivý, všestranný a snadno použitelný v kombinaci s CE. Pomocí metody CE-ESI-MS může být stanoveno 19 nederivatizovaných základních aminokyselin a dá se použít mimo jiné při analýze aminokyselin v sójové omáčce, pivu, saké a moči. Výhodami této metody je stanovení bez derivatizace v krátké době analýzy, citlivost, selektivita bez jiných interferencí matrice, reprodukovatelnost, dlouhodobá stabilita a minimální úprava vzorku. Separace se provádí na kapilárách z taveného křemene a jako elektrolyt je používán roztok kyseliny mravenčí při pH nižším než 2,77, aby aminokyseliny migrovaly ke katodě, což je směr rozhraní elektrospreje.<sup>[25, 32, 33]</sup>



#### 2.4.3.2 Izotachoforetické stanovení

Aminokyseliny jsou v biologickém materiálu často analyzovány, ale izotachoforéza není v tomto směru příliš používána. Amfoterní charakter aminokyselin je hlavním problémem při izotachoforetické analýze. V izotachoforéze mohou být aminokyseliny analyzovány buď jako anionty nebo kationty. Analýza aniontů je lepší, protože existuje větší diference hodnot pK aminoskupiny. Kationtovou izotachoforézou lze analyzovat pouze bazické aminokyseliny (lysin, arginin a histidin). Aniontovou izotachoforézou lze analyzovat většinu aminokyselin, ale až v alkalické oblasti (pH vyšší než 10), kdy hydrogenuhličitany vzniklé absorpcí CO<sub>2</sub> ze vzduchu narušují zóny a prodlužují analýzu. Více se využívá ITP analýza jen vybraných aminokyselin než stanovení všech základních aminokyselin během jedné analýzy.<sup>[34, 35]</sup>

Kapilární izotachoforéza s konduktometrickou detekcí v kationtovém režimu bývá používána pro separaci a stanovení bazických aminokyselin ve farmaceutických přípravcích. Optimální vedoucí elektrolyt je 10 mmol/l octan sodný upravený kyselinou octovou na pH 4,0. Jako koncový elektrolyt je použit 10 mmol/l β-alanin. Tato metoda je citlivá, jednoduchá, rychlá (jedna analýza trvá 10 minut) a vysoce reprodukovatelná pro stanovení bazických aminokyselin s minimální úpravou a spotřebou vzorku. Navrhovaná ITP metoda může být vhodná i pro analýzu složitých biologických vzorků, kde je použita jako čistící a předkoncentrační fáze CE v on-line kombinované metodě ITP-CZE.<sup>[36]</sup>

Výskyt abnormálních hladin kyseliny asparagové, asparaginu, kyseliny glutamové a glutaminu může být obtížně stanovitelný v séru nebo moči u dětí trpících různými metabolickými poruchami ovlivňujícími nervový systém. Volné aminokyseliny a další složky s nízkou molekulovou hmotností mohou být odděleny od vzorků lidského krevního séra membránovou ultrafiltrací a dále analyzovány pomocí izotachoforézy bez další úpravy. Vysokomolekulárních látek je možné se zbavit centrifugací a filtrací. Jako vedoucí elektrolyt byl použit chloridový aniont pro svou vysokou pohyblivost při pH 8,9 – 9,3. Koncový elektrolyt musí mít nižší efektivní pohyblivost než stanovované aminokyseliny při pH nad 10,0, aby bylo zabráněno interferencím hydrogenuhličitany. Pomocí kombinace UV detektoru a vodivostního detektoru je možné dosáhnout detekčního limitu 1 – 10 nmol. U látek absorbujících v UV oblasti lze dosáhnout detekčního limitu až 16 pmol.<sup>[37]</sup>

Vyvinutím metody umožňující miniaturizovanou izotachoforetickou analýzu aminokyselin byl vyřešen problém kontaminace uhličitany volbou vhodného elektrolytového systému. Jako vedoucí elektrolyt byla použita kyselina glykolová při pH 9,0 a přidaným proti iontem byl hořečnatý kationt. Koncovým elektrolytem byl  $\beta$ -alanin při pH 9,7. Miniaturizované ITP zařízení je umístěno na poly(methylmethakrylátové) destičce s integrovanou kolonou s vodivostním detektorem. Díky této ITP analýze může být analyzováno až 7 aminokyselin (alanin, asparagin, kyselina asparagová, cystein, kyselina glutamová, fenylalanin a serin) za krátký čas s využitím v biochemii a potravinářské chemii.<sup>[38]</sup>

Izotachoforéza s gradientovou elucí je účinná obohacovací technika za použití kontinuálního vstřikování vzorku proti proměnlivému protiproudu elektrolytu s vysokou elektroforetickou mobilitou. Což znamená, že je vzorek vnášen do rezervoáru s koncovým elektrolytem, kdy vedoucí elektrolyt obsahující pufr je mechanicky unášen kolonou proti koncovému elektrolytu až dojde k jejich smísení. Snížením protiproudu dojde k odebrání obohaceného zásobního analytu do kapiláry pro UV detekci. Tato metoda byla použita při analýze kyseliny asparagové a glutamové v silně zasolených maticích jako je mozkomíšni mok, moč, sliny, sérum nebo mořská voda. K oddělení a detekci dojde za méně než 25 minut.<sup>[39]</sup>

Izotachoforéza s gradientovou elucí může používat i UV detektor bez nutnosti fluorescenčních analytů nebo derivatizace, čímž se sníží náklady metody. Touto metodou mohou být analyzovány aminokyseliny jako je tryptofan a tyrosin za méně než 6 minut, jelikož aromatický systém obsahuje konjugované dvojně vazby a tím pádem není potřeba derivatizace pro UV absorpční detekci.<sup>[40]</sup>

Pro stanovení kyseliny asparagové a glutamové v rajčatové šťávě lze také využít kapilární izotachoforézu. Jako vedoucí elektrolyt se používá 10 mmol L-histidin monohydrochlorid upravený na pH 5,5 pomocí 1 % poly(vinylpyrrolidinu) a jako koncový elektrolyt 5 mmol morfolinethansulfonová kyselina upravená na pH 6,0 pomocí tris(hydroxymethyl)aminomethanem. ITP analýza aminokyselin v rajčatové šťávě je jednoduchá, má nízké náklady a je to dobrá alternativa k HPLC. Touto metodou byly analyzovány různé odrůdy rajčat, ale i komerční rajčatové šťávy. Kyselina glutamová a asparagová se běžně vyskytují v rajčatech, a díky této metodě při analýze komerčních šťáv se dá odhalit přidávání glutamátu a aspartátu do těchto šťáv pro podpoření rajčatové chuti ve šťávách.<sup>[41]</sup>

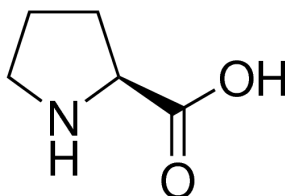
#### 2.4.4 Hmotnostní spektrometrie

Nejčastějším úkolem hmotnostní spektrometrie v biochemii je identifikace neznámých proteinů v roztoku nebo po elektroforéze v polyakrylamidovém gelu. Jedním z možných přístupů je metoda peptidového mapování. Tato metoda je založena na předpokladu, že specifickým štěpením určitého proteinu získáme soubor peptidů, který je unikátní pro tento protein.<sup>[42]</sup>

Prvním krokem při peptidovém mapování je tedy rozštěpení neznámého proteinu specificky štěpící proteasou, nejčastěji trypsinem. Trypsin se používá z důvodu své vysoké specifity, je levný a vytváří peptidy o průměrné délce 10 – 20 aminokyselin vhodné pro analýzu pomocí hmotnostní spektrometrie. Hmotnosti vzniklých peptidů se nejčastěji stanovují pomocí MALDI-TOF. Získané hmotnosti peptidů se porovnávají s hmotnostmi peptidů vzniklých stejným způsobem z některé známé bílkoviny. K tomuto postupu slouží celá řada programů využívajících veřejně dostupné databáze proteinových sekvencí. Výsledkem hledání je seznam proteinů, jejichž štěpením mohou vzniknout peptidy o změřených hmotnostech.<sup>[42]</sup>

#### 2.5 Prolin

Prolin (kyselina pyrrolidin-2-karboxylová) (Obrázek 19) je zvláštní tím, že na  $\alpha$ -uhlíku nemá primární aminoskupinu, ale sekundární skupinu, jako součást pyrrolidinového kruhu. Stechiometrický vzorec prolinu je  $C_5H_9NO_2$  a jeho molekulová hmotnost je 115,132 g/mol.  $pK_A$  prolinu je 1,99,  $pK_B$  je 10,60 a  $pI$  při 25 °C je 6,30. Je to bílý krystalický prášek, bez zápachu, sladké chuti. Taje a následně se rozkládá mezi 220 až 222 °C. Je stabilní a dobře rozpustný ve vodě i v organických rozpouštědlech, nejlépe v ethanolu.<sup>[1, 43]</sup>



Obrázek 19: Struktura L-prolinu

Prolin je cyklická, pro člověka neesenciální aminokyselina, která je složkou mnoha bílkovin. V kolagenu tvoří prolin téměř třetinu všech aminokyselin. Kolagen je hlavní podpůrný protein pokožky, šlach, kostí a pojivové tkáně. Rostliny používají prolin pro výrobu pylu.<sup>[43]</sup>

Prolin je odvozen od aminokyseliny L-glutamátu, ze kterého je nejprve tvořen glutamát-5-semialdehydpomocí glutamát-5-kinázy a glutamát-5-semialdehyddehydrogenázy, která pro svou činnost vyžaduje NADH nebo NADPH. Tento semialdehyd může buď spontánně cyklizovat za vzniku 1-pyrrolin-5-karboxylové kyseliny, která se redukuje na prolin pyrolin-5-karboxylátreduktázou, a nebo je převeden na ornitin ornitin-aminotransferázou a následnou cyklizací pomocí ornitin-cyklodeaminázy za vzniku prolinu.<sup>[43]</sup>

Za určitých podmínek může prolin působit jako neurotoxin a metabotoxin. Neurotoxin způsobuje poškození nervových buněk a nervových tkání. Metabotoxin je endogenně produkovaný metabolit, který způsobuje nepříznivé zdravotní účinky, pokud je přítomen dlouhodobě ve vysokých hladinách. Dlouhodobé vysoké hladiny prolinu se projevují nejméně u pěti vrozených metabolických poruch, včetně hyperprolinémie (vysoká hladina prolinu v krvi způsobující neurologické, popř. psychiatrické poruchy).<sup>[43]</sup>

Hyperprolinémie a hydroxyprolinémie jsou vrozené vady metabolismu iminokyselin, které nejsou vždy spojené s klinickým onemocněním. Byly zjištěny tři odlišné vady: u prolin oxidasy (hyperprolinémie typu I), v dehydrogenáze pyrolin-5-karboxylové kyseliny (hyperprolinémie typu II) a u hydroxyprolinoxidázy (hydroxyprolinémie).<sup>[44]</sup>

Hyperprolinémie typu I a typu II jsou odlišné nemoci určené geneticky odlišnými autosomálními recesivními geny. Hyperprolinémie typu I je patrná i u některých heterozygotů. Hydroxyprolinémie je patrně autozomálně recesivně dědičná (nevyskytuje se v každé generaci, ale „ob generaci“).<sup>[44]</sup>

Hyperprolinémie typu I byla poprvé rozpoznána v rodině, ve které se mezi členy rodiny vyskytovala různá mozková dysfunkce, renální anomálie, nefropatie a hluchota. V případě hyperprolinémie typu II byla u některých pacientů pozorována mentální retardace a sklony k neurologickým záchvatům, nicméně někteří pacienti nevykazovali

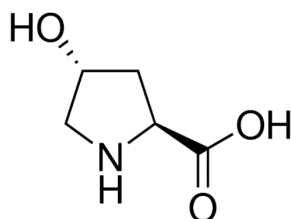
žádné známky nemoci. Hydroxyprolinémie byla popsána u mentálně retardované dívky s hematurií, mikroskopickou pyurií, malými ledvinami a nízkým vzrůstem.<sup>[44]</sup>

Prolin je přítomen ve většině bílkovin v množství 4 – 7 %, průměrný obsah je 4,6 %. V gliadinech pšeničného lepku je jeho obsah asi 10 %, v kaseinu asi 12 %, v želatině bývá až 13 % prolinu. Velké množství prolinu je vázáno v kolagenu, který je hlavním podpůrným proteinem pokožky, šlach, kostí a pojivových tkání. Je jeho hlavní aminokyselinou, což je také příčinou sekundární trojšroubovicové struktury tropokolagenu. U bakterií, rostlin i živočichů rovněž hraje určitou roli jako osmoprotektant.<sup>[1, 2]</sup>

Prolin se vyskytuje také ve včelím medu, kde jeho obsah může být až 500 mg na 1 kg medu. Množství prolinu v medu je indikátorem jeho kvality. Pokud je zjištěno, že jeho obsah je pod 180 mg/kg medu, je med považován za falšovaný, tj. ředěný vodou nebo doslazený cukrem.<sup>[45]</sup>

## 2.6 Hydroxyprolin

Hydroxyprolin (Obrázek 20) je neesenciální aminokyselinový derivát vytvořený během posttranslační modifikace proteinů hydroxylací aminokyseliny prolinu enzymem prolylhydroxylázou, který vyžaduje vitamin C jako kofaktor. Stechiometrický vzorec hydroxyprolinu je  $C_5H_9NO_3$  a jeho molekulová hmotnost je 131,131 g/mol.  $pK_A$  hydroxyprolinu je 1,82,  $pK_B$  je 9,65 a  $pI$  při 25 °C je 5,74. Je to bílý krystalický prášek, bez zápachu. Bod tání je kolem 274 °C.<sup>[46]</sup>



Obrázek 20: Struktura L-4-hydroxyprolinu

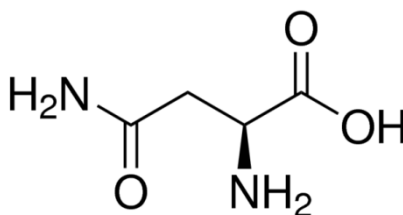
Hraje klíčovou roli ve stabilitě kolagenové trojšroubovice. Lze jej použít jako indikátor k určení množství kolagenu. Zvýšené hladiny hydroxyprolinu v moči a v séru jsou obvykle spojeny s degradací pojivové tkáně. Nedostatek vitamínu C snižuje konverzi prolinu na hydroxyprolin, což vede ke snížení stability kolagenu.<sup>[46]</sup>

Hydroxyprolin vzniká při rozbourávání kostního kolagenu, kumuluje se v játrech a v ledvinách dochází k jeho zpětnému vstřebávání. Močí se z těla vyloučí jen 25 % hydroxyprolinu. Jeho koncentrace v moči by měla být mezi 16 – 22 mmol/mol kreatininu. Pokud jsou výsledky vyšší než optimální hodnota, ukazuje to na metabolickou osteopatii. Pacienti musí před vyšetřením držet 24 hodinovou bezkolagenovou dietu, což znamená vyhýbat se masu a želatině.<sup>[47]</sup>

Přibližně polovina z prolinových zbytků v kolagenu je posttranslačně hydroxylována na 4- nebo 3-hydroxyprolin. L-4-hydroxyprolin je důležitou strukturní složkou proteinu kolagenu a želatiny (obsah asi 12 %) a polypeptidu (glykopeptidu) buněčných stěn rostlin extensinu. Ve většině dalších bílkovin je jeho obsah nízký. Množství 4-hydroxyprolinu v masných výrobcích proto koreluje s množstvím použitých méně kvalitních surovin, např. kůže, kde je kolagen hlavní bílkovinou.<sup>[1, 2]</sup>

## 2.7 Asparagin

Asparagin (4-amid kyseliny asparagové) (Obrázek 21) je neesenciální neutrální aminokyselina, která se podílí na metabolické regulaci buněčných funkcí v nervových a mozkových tkáních. V mnoha biochemických syntézách je uvedený amid významným zdrojem (donorem) aminoskupiny. Stechiometrický vzorec asparaginu je  $C_4H_8N_2O_3$  a jeho molekulová hmotnost je 132,119 g/mol.  $pK_A$  asparaginu je 2,02,  $pK_B$  je 8,80 a  $pI$  při 25 °C je 5,41. Je to bílý krystalický prášek, bez zápachu. Bod tání je v rozmezí 234-235 °C.<sup>[1, 48]</sup>



Obrázek 21: Struktura L-asparaginu

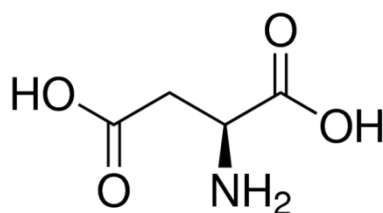
Asparagin je amidový derivát kyseliny asparagové a hraje důležitou roli v biosyntéze glykoproteinů a dalších proteinů. Asparagin je netoxický nosič zbytkového amoniaku, který má být odstraněn z těla. Asparagin působí také jako diuretikum.<sup>[48]</sup>

Biosyntetizuje se z kyseliny asparagové a amoniaku asparagin-syntetázou. Předchůdcem asparaginu je oxalacetát, který se převádí na aspartát za použití transaminázového enzymu. Enzym přenáší aminoskupinu z glutamátu na oxalacetát, čímž vzniká  $\alpha$ -ketoglutarát a aspartát. Enzym asparagin-syntetáza produkuje asparagin, AMP, glutamát a pyrofosfát z aspartátu, glutaminu a ATP. Při reakci asparagin-syntetázy se ATP používá k aktivaci aspartátu, čímž vzniká  $\beta$ -aspartyl-AMP. Glutamin dodává amoniovou skupinu, která reaguje s  $\beta$ -aspartyl-AMP za vzniku asparaginu a volného AMP.<sup>[48]</sup>

Reakce mezi asparaginem a redukujícími cukry nebo reaktivními karbonyly produkuje akrylamid v potravinách při ohřátí na dostatečnou teplotu (pečení). Asparagin byl nejprve izolován z chřestové šťávy, ve které je ho dostatečné množství.<sup>[48]</sup>

## 2.8 Kyselina asparagová

Kyselina asparagová (kyselina 2-aminobutandiová) (Obrázek 22) nese ve svém řetězci druhou kyselou skupinu. Zbytek této aminokyseliny udává proteinům za fyziologického pH záporný náboj. Stechiometrický vzorec kyseliny asparagové je  $C_4H_7NO_4$  a její molekulová hmotnost je 133,103 g/mol.  $pK_{A1}$  kyseliny asparagové je 1,92,  $pK_{A2}$  je 3,87,  $pK_B$  je 9,87 a  $pI$  při 25 °C je 2,98. Je to bílý krystalický prášek, kyselé chuti. Bod tání je kolem 270 °C.<sup>[1, 49]</sup>



Obrázek 22: Struktura kyseliny L-asparagové

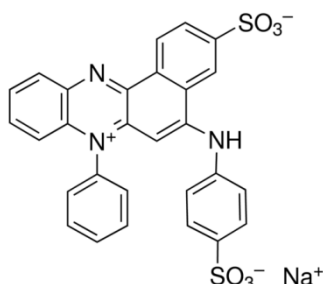
Kyselina asparagová se vyskytuje u zvířat a rostlin, zejména v cukrové třtině a cukrové řepě. Je to neesenciální aminokyselina, která hraje důležitou roli při syntéze jiných aminokyselin a v cyklu kyseliny citronové, v močovinovém cyklu a metabolismu DNA. Kyselina asparagová slouží jako neurotransmitter, tudíž může poskytnout

odolnost proti únavě, a tak může vést k vytrvalosti. Vyrábí se z kyseliny glutamové enzymy používajícími vitamín B<sub>6</sub> jako kofaktor. Kyselina asparagová s aminokyselinou fenylalaninem je součástí umělého sladidla aspartamu.<sup>[49]</sup>

Průměrný obsah kyseliny asparagové v bílkovinách je 5,5 %, asparaginu 4,4 %. Z živočišných bílkovin se v největším množství vyskytuje asparagová kyselina v globulinech a v proteinech albuminů a globulinů (6 – 10 %). Rostlinné bílkoviny obsahují od 3 do 13 % asparagové kyseliny spolu s asparaginem (např. bílkoviny pšenice asi 4 %, bílkoviny kukuřice asi 12 %).<sup>[2]</sup>

## 2.9 Azokarmin G

Azokarmin G neboli rosindulin neboli kyselá červeň (Obrázek 23) je intenzivně šarlatově červené barvivo používané v mikroskopii. Jedná se o prášek málo rozpustný ve vodě, ale dobře rozpustný v silně alkalickém roztoku. Stechiometrický vzorec je C<sub>28</sub>H<sub>18</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>6</sub>S<sub>2</sub> a molekulová hmotnost je 579,58 g/mol. Patří mezi kyselá barviva používaná v histologii, která se mimo jiné používají k barvení cytoplasmy.<sup>[50, 51, 52]</sup>



Obrázek 23: Struktura azokarminu G

Kyselá (aniontová) barviva se vážou na kationtové složky (např. různé cytoplasmatické proteiny, hemoglobin, mitochondrie, některá hromadící a sekreční granula), ty se proto označují jako acidofilní nebo eosinofilní.<sup>[50, 51, 52]</sup>

Cílem standardního barvení je zdůraznit nejdůležitější struktury tkání tak, aby mohly být od sebe odlišeny. Principem jsou různé afinity barviv k určitým složkám tkání. Většina barvicích metod byla vyvinuta empiricky, pro mnohé doposud není objasněn přesný chemický mechanismus. Často jsou za barvení zodpovědné elektrostatické interakce mezi barvivem a složkou tkáně.<sup>[50, 51, 52]</sup>



### 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1 Použité chemikálie

Chemikálie	Čistota	Výrobce
Azokarmin G		
$\beta$ -alanin	p.a.	Serva-Heidelberg
Dusitan sodný	p.a.	Sigma Aldrich
Kyselina chlorovodíková 36 %	p.a.	Penta
Kyselina octová 99 %	p.a.	Penta
Octan sodný	p.a.	Lachema-Brno
L-asparagin	$\geq 98 \%$	Sigma-Aldrich
kyselina L-asparagová	$\geq 99 \%$	Sigma-Aldrich
L-prolin	$\geq 99 \%$	Sigma-Aldrich
L-hydroxyprolin	p.a.	Reanal

#### 3.2 Příprava roztoků

##### Příprava 1 M NaNO<sub>2</sub>

Na analytických vahách bylo naváženo 34,5 g dusitanu sodného. Navážka byla převedena do 500 ml odměrné baňky a destilovanou vodou doplněna po rysku.

##### Příprava 1 M CH<sub>3</sub>COOH

Do 500 ml odměrné baňky bylo odměřeno 28,3 ml 99 % kyseliny octové a baňka byla doplněna po rysku destilovanou vodou.

#### Příprava 1 M HCl

Do 100 ml odměrné baňky bylo odpipetováno 8,6 ml 36 % kyseliny chlorovodíkové. Baňka byla doplněna po rysku destilovanou vodou.

#### Příprava 0,001 M kyseliny asparagové

Na analytických vahách bylo naváženo 0,0067 g kyseliny asparagové. Navážka byla kvantitativně převedena do 50 ml odměrné baňky a destilovanou vodou doplněna po rysku.

#### Příprava roztoku barviva azokarminu G

Byl připraven roztok barviva rozpuštěním několika krystalků v malém množství destilované vody za pomoci ultrazvukové lázně.

### **3.3 Příprava roztoků aminokyselin a jejich konverze**

#### Postup konverze prolinu

Na analytických vahách bylo naváženo 100 mg prolinu, ten byl kvantitativně převeden do 100 ml odměrné baňky. Bylo přidáno 10 ml 1 M dusitanu sodného a 10 ml 1 M kyseliny octové. Po rozpuštění byla baňka doplněna po rysku destilovanou vodou, bylo do ní vhozeno magnetické míchátko a baňka byla vložena do vroucí vodní lázně. Směs byla za stálého míchání zahřívána po dobu přesně 10 minut, poté byla baňka okamžitě zchlazena pod tekoucí vodou. Před izotachoforetickou analýzou byl vzorek 2x naředěn, přičemž bylo pipetováno 25 ml konvertovaného roztoku prolinu do 50 ml odměrné baňky a roztok byl doplněn destilovanou vodou po rysku.

Stejným způsobem bylo postupováno při konverzi hydroxyprolinu.

#### Příprava asparaginu

Na analytických vahách bylo naváženo 50 mg asparaginu, obsah byl převeden do 50 ml odměrné baňky. Do baňky bylo přidáno 5 ml 1 M dusitanu sodného a 5 ml 1 M kyseliny octové. Za pomoci ultrazvukové lázně byl obsah rozpuštěn a baňka byla

doplněna destilovanou vodou po rysku. Do baňky bylo vhozeno magnetické míchátko a baňka byla vložena do vroucí vodní lázně, kde byla za stálého míchání zahřívána po dobu 10 minut. Po uplynutí reakční doby byla baňka zchlazena pod tekoucí vodou. Před izotachoforetickou analýzou byl vzorek 2x naředěn, přičemž bylo pipetováno 25 ml konvertovaného roztoku prolinu do 50 ml odměrné baňky a roztok byl doplněn destilovanou vodou po rysku.

Stejným způsobem bylo postupováno při konverzi kyseliny asparagové.

### 3.4 Elektrolytové systémy

#### Elektrolytový systém I

*Vedoucí elektrolyt (LE):* 0,01 M HCl +  $\beta$ -alanin (pH 2,4)

Do 500 ml odměrné baňky bylo odpipetováno 5 ml 1 M HCl a následně byla baňka doplněna po rysku destilovanou vodou. Do tohoto roztoku byl za míchání přidáván pevný  $\beta$ -alanin dokud nebylo dosaženo požadované hodnoty pH 2,4.

*Koncový elektrolyt (TE):* 0,01 M CH<sub>3</sub>COONa

Na analytických vahách bylo naváženo 0,082 g octanu sodného. Navážka byla převedena do 100 ml odměrné baňky, která byla doplněna destilovanou vodou po rysku.

#### Elektrolytový systém II

*Vedoucí elektrolyt (LE):* 0,01 M HCl +  $\beta$ -alanin (pH 3,6)

Do 500 ml odměrné baňky bylo odpipetováno 5 ml 1 M HCl a baňka byla doplněna destilovanou vodou po rysku. Do tohoto roztoku byl za míchání přidáván pevný  $\beta$ -alanin do té doby, než bylo dosaženo hodnoty pH 3,6.

*Koncový elektrolyt (TE):* 0,01 M CH<sub>3</sub>COONa

Příprava viz elektrolytový systém I.

### 3.5 Přístroje a zařízení

Elektroforetický analyzátor EA 102 doplněn o mikropreparativní kohout pro odběr frakce, Villa Labeco, Spišská Nová Ves, Slovenská republika

Hmotnostní spektrometr micrOTOF-Q, Bruker Daltonics, Německo

Infuzní pumpa KDS 100m, KD Scientific, Holliston, MA, USA

Laboratorní pH metr S1400 Sentron, Nizozemsko

Analytické váhy KERN ABT 120-4M, Gottel, KERN & Sohn GmbH, Německo

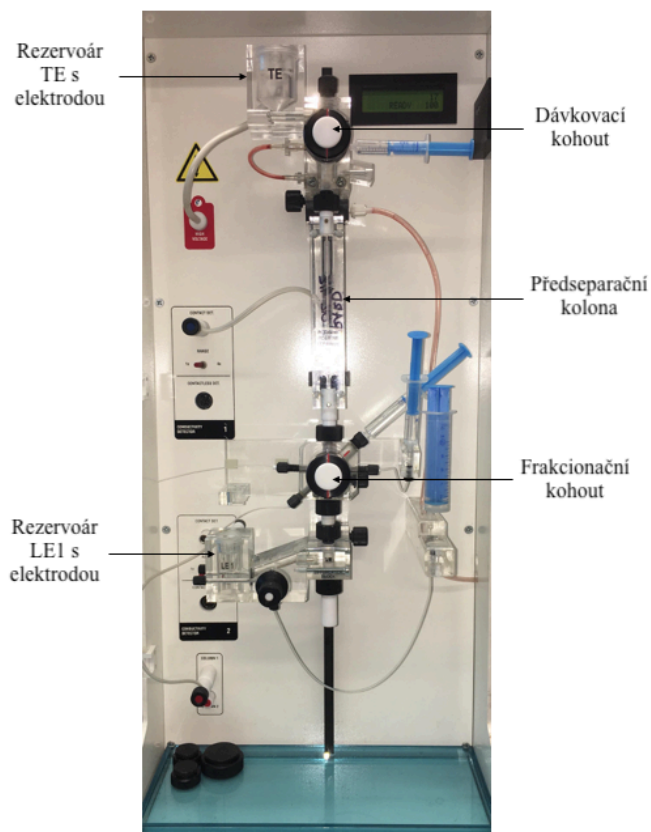
Ultrazvuková lázeň K2, KRAINTEK s.r.o., Slovensko

Pipety Biohit

Běžné laboratorní sklo a pomůcky

#### 3.5.1 Elektroforetický/izotachoforetický analyzátor EA 102

Jedná se o izotachoforetický analyzátor (Obrázek 24) vybavený dvěma kolonami. Předseparační kolona o průměru 0,8 mm je dlouhá 160 mm a její objem je 100  $\mu$ l, analytická kolona o průměru 0,3 mm je dlouhá 160 mm o objemu 10  $\mu$ l. Předseparační kolona je vybavena vodivostním detektorem a je spojená s analytickou kolonou pomocí bloku spojení kolon, na který navazuje rezervoár LE1 pro vedoucí elektrolyt. Při analýze byla analytická kolona nahrazena mikropreparativním kohoutem. Ten umožňuje odebírat frakce o objemu 5  $\mu$ l. Mikropreparativní kohout je přes spojku napojen na rezervoár LE2 pro vedoucí elektrolyt. Vzorek je vnášen dávkovacím kohoutem o objemu 30  $\mu$ l. Pracovní proud je nastavitelný nezávisle pro obě kolony, jeho maximální hodnota je 500  $\mu$ A. Detekce je prováděna na vodivostním detektoru. Řízení analýzy i její vyhodnocení je prováděno počítačově v programu ITPPro.

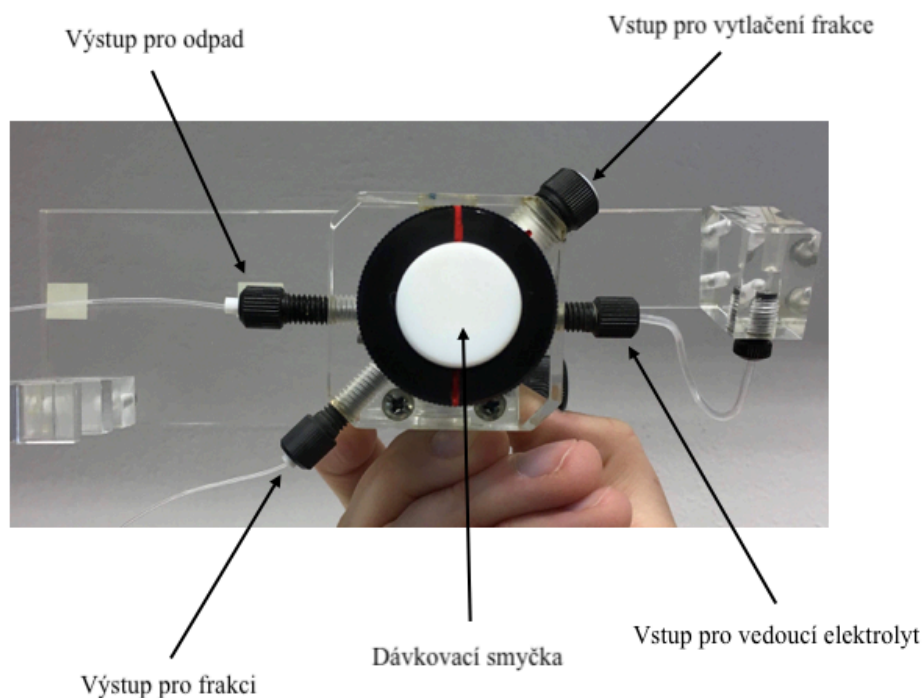


Obrázek 24: Elektroforetický/izotachoforetický analyzátor EA 102

### 3.5.1.1 Pracovní podmínky ITP analýzy

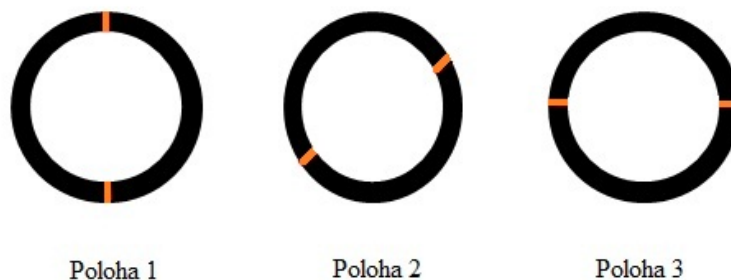
Všechny analýzy probíhaly pouze v předseparační koloně, kde byl nastaven hnací proud na hodnotu  $200 \mu\text{A}$ . Celková doba měření prolinu a hydroxyprolinu se pohybovala okolo 1 hodiny a při měření asparaginu a kyseliny asparagové doba měření nepřesáhla 30 minut.

### 3.5.2 Mikropreparativní kohout



Obrázek 25: Mikropreparativní kohout

Mikropreparativní kohout (Obrázek 25) je ovládán ručně. Na Obrázku 26 jsou uvedené polohy mikropreparativního kohoutu. V průběhu analýzy je kohout v poloze 1. Kohout spojen s predseparační kolonou je nejprve naplněn vedoucím elektrolytem a pak je zapnuto elektrické napětí. Software, pomocí kterého se elektroforetický analyzátor EA 102 ovládá, umožňuje pozastavení elektrického proudu a následné zapnutí. Pro odebrání frakce je nutné analýzu pozastavit a umístit kohout do polohy 2. pomocí injekční stříkačky naplněné destilovanou vodou se vytlačí frakce do připravené skleněné vialky. Poté je kohout přepnut do polohy 3, kapilára je naplněna vedoucím elektrolytem a kohout je umístěn zpátky do polohy 1. Poté je analýza pomocí softwaru opět spuštěna.



Obrázek 26: Polohy mikropreparativního kohoutu

### 3.5.3 Hmotnostní spektrometr micrOTOF-Q

Hmotnostní spektra byla měřena na hmotnostním spektrometru s hybridním QqTOF analyzátozem s využitím ionizace elektrosprejem při snímání záporných iontů v rozsahu  $m/z$  50 – 400. Před jednotlivými měřeními byl přístroj externě kalibrován mravenčanem sodným. Jednotlivé vodné frakce studovaných aminokyselin byly do hmotnostního spektrometru zavedeny pomocí infuzní pumpy KDS 100.

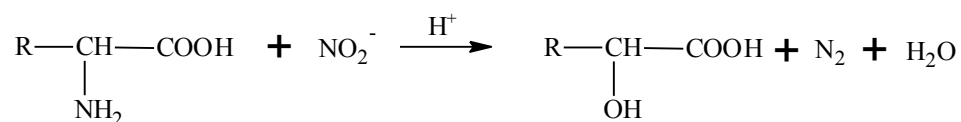
#### 3.5.3.1 Pracovní podmínky hmotnostní spektrometrie

Jednotlivé parametry zdroje byly nastaveny následovně: napětí na kapiláře 3 kV, teplota sušícího plynu 180 °C, průtok a tlak dusíku 4 l/min a 0,4 bar, vnášení pomocí infuzní pumpy při průtoku 5  $\mu$ l/minutu.

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Pomocí izotachoforézy lze stanovit látky, které jsou za daných podmínek elektricky nabitě a také mají dostatečnou efektivní pohyblivost v elektrickém poli. Většina aminokyselin má jak záporný, tak kladný náboj, tudíž má v oblasti neutrálního nebo slabě kyselého či bazického pH charakter amfolytu. Výjimku tvoří kyselé nebo bazické aminokyseliny, ale většinu aminokyselin nelze izotachoforeticky přímo analyzovat.

Byla proto využita reakce (Obrázek 27), kterou popsal v roce 1910 Donald D. Van Slyke a to konverze aminokyseliny pomocí kyseliny dusité. Při této reakci dochází k nahrazení aminoskupiny hydroxyskupinou. Kyselina dusitá byla připravena *in-situ* z dusitanu sodného a kyseliny octové.

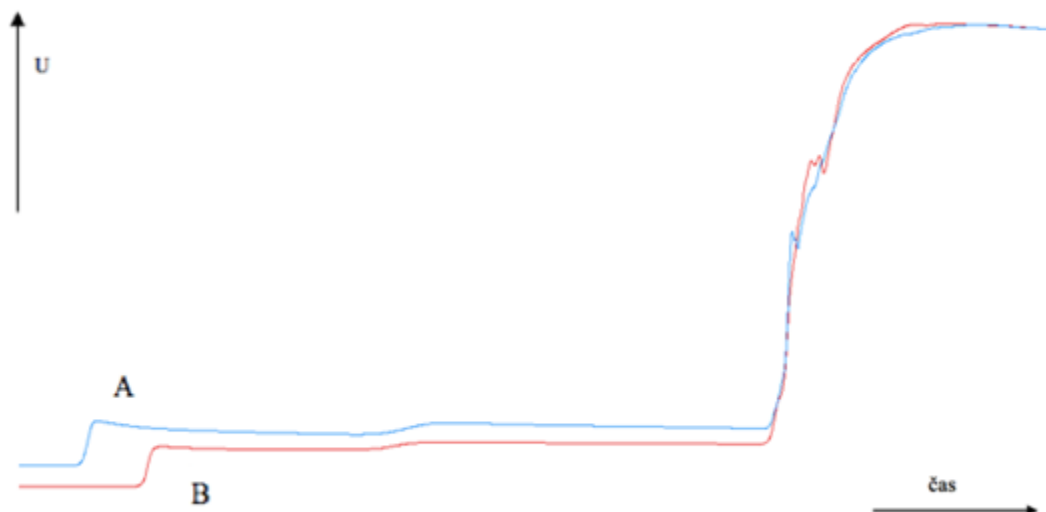


Obrázek 27: Reakce konverze aminokyseliny s dusitanem a kyselinou octovou

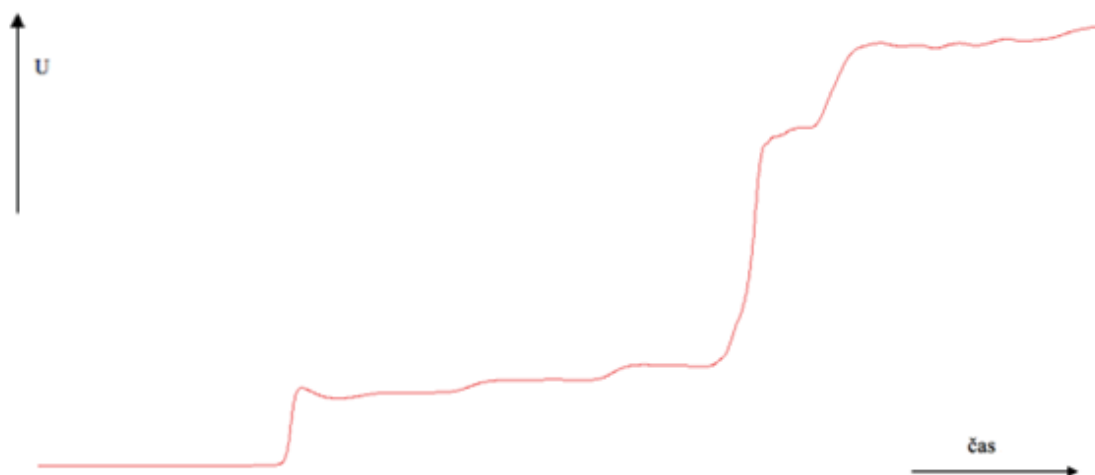
### 4.1 Prolin a hydroxyprolin

Nejprve byl připraven roztok prolinu a hydroxyprolinu viz Kapitola 3.3, který byl následně proměřen na izotaforetickém analyzátoru za použití elektrolytového systému I při pH 2,4. Z izotachoforetického záznamu (Obrázek 28) je patrné, že prolin i hydroxyprolin tvoří po konverzi dvě zóny, přičemž první produkt prolinu má stejnou efektivní mobilitu jako druhý produkt hydroxyprolinu. Při separaci směsi prolinu a hydroxyprolinu (Obrázek 29) byly na záznamu patrné pouze 3 zóny, kdy první zóna odpovídá prvnímu produktu prolinu, druhá zóna zahrnuje druhý produkt prolinu a první produkt hydroxyprolinu a třetí zóna odpovídá druhému produktu hydroxyprolinu. U obou aminokyselin byla odebírána frakce z každé zóny, tudíž pro každou aminokyselinu byly odebrány dvě frakce.





Obrázek 28: Izotachoforetické záznamy standardů prolinu (4,3 mM roztok) (A) a hydroxyprolinu (3,8 mM roztok) (B) po konverzi. Elektrolytový systém I (pH 2,4)



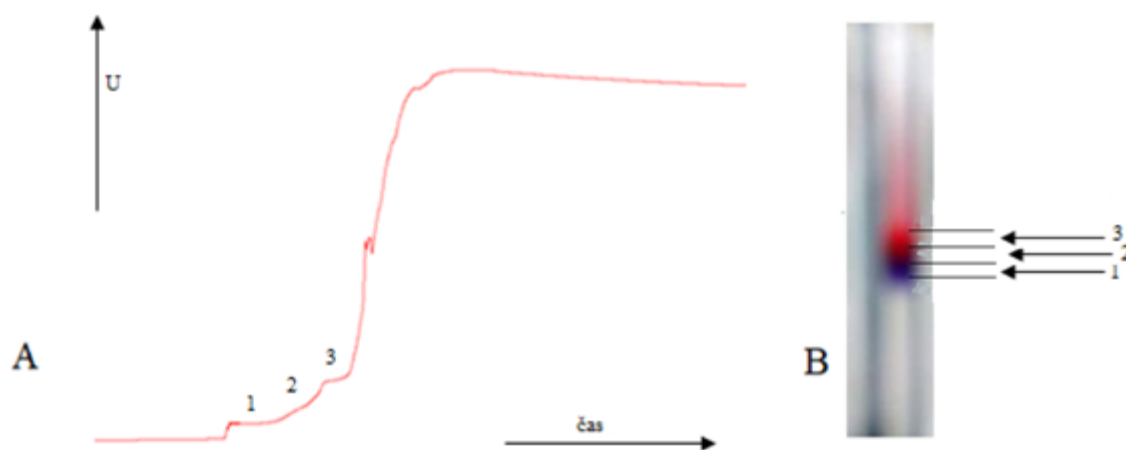
Obrázek 29: Izotachoforetický záznam směsi prolinu (4,3 mM roztok) a hydroxyprolinu (3,8 mM roztok). Elektrolytový systém I (pH 2,4)

Pro přesné načasování odběru byl zkoušen přídavek barviva azokarminu G ke směsi prolinu a hydroxyprolinu. Azokarmin G reagoval se směsí a zdeformoval zóny, jak je ukázáno na Obrázku 30.



Obrázek 30: Izotachoforetické záznamy směsi prolinu (4,3 mM roztok) a hydroxyprolinu (3,8 mM roztok) bez barviva (A) a s barvivem (B). Elektrolytový systém I (pH 2,4)

Z tohoto důvodu bylo barvivo rozpuštěno v destilované vodě a změřeno samostatně na izotachoforetickém analyzátoru. Bylo zjištěno, že azokarmin G se rozděluje na 3 různě barevné zóny (nejrychleji migrující fialová, uprostřed vínová a nejpomalejší růžovočervená), které byly viditelné v předseparační kapiláře (Obrázek 31 B) a následně i detekovány vodivostním detektorem (Obrázek 31 A).



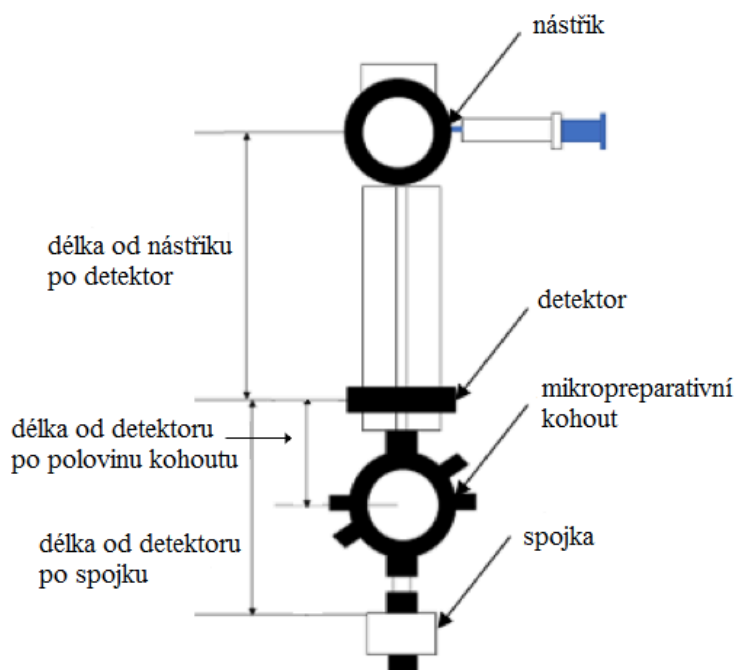
Obrázek 31: Izotachoforetický záznam azokarminu G – vodivostní záznam (A) a fotografie zón během analýzy (B). Elektrolytový systém I (pH 2,4)

Během analýzy byl změřen čas migrace barviva od nástřiku po detektor a následně čas od detektoru po spojku. Dále ze známého objemu kolony byl vypočítán

objem kanálu vedoucího od detektoru přes frakcionační kohout až po spojku a z něj následně průměr tohoto kanálu. Všechny zmíněné parametry jsou uvedeny v Tabulce 2 a znázorněny na Obrázku 31. Bylo zjištěno, že kanál má téměř stejný průměr jako je průměr kolony. Vzhledem k tomu, že vzdálenost mezi detektorem a spojkou a vzdálenost mezi detektorem a polovinou kanálu v mikropreparativním kohoutu byla přibližně poloviční, byly pro odběr frakce vybrány časy, které jsou přibližně poloviční jako čas migrace barviva od detektoru po spojku (konkrétně časy 230, 240, 250, 260, 270, 280 a 290 s).

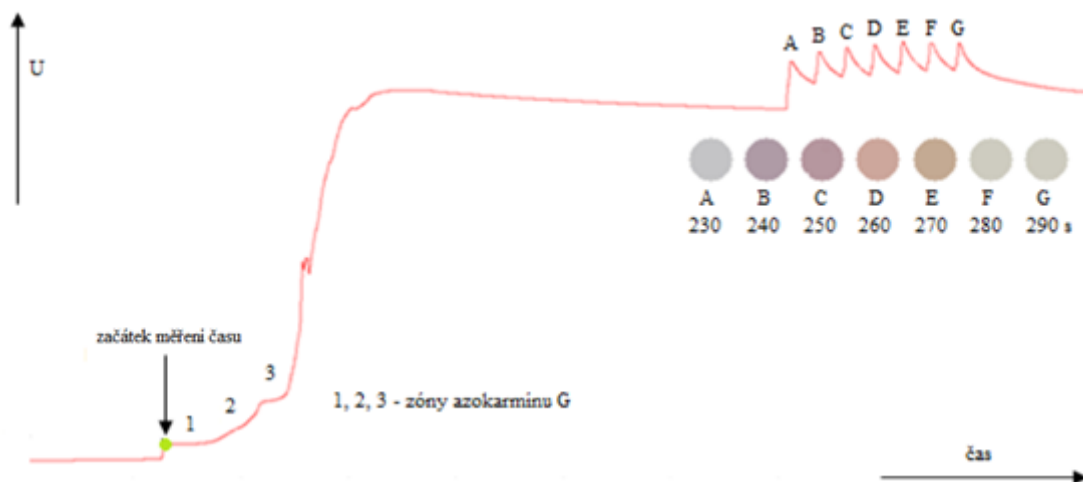
Tabulka 2: Převzaté, naměřené a vypočtené parametry kolony a mikropreparativního kohoutu

Čas od nástřiku po detektor	1072 s
Čas od detektoru po spojku	569 s
Objem kolony od nástřiku po detektor	100 $\mu$ l
Objem od detektoru po spojku	53 $\mu$ l
Délka od detektoru po spojku	11,8 cm
Průměr kolony	0,8 mm
Průměr kanálu v mikropreparativní kohoutu	0,76 mm
Délka od detektoru po polovinu mikropreparativního kohoutu	5,5 cm



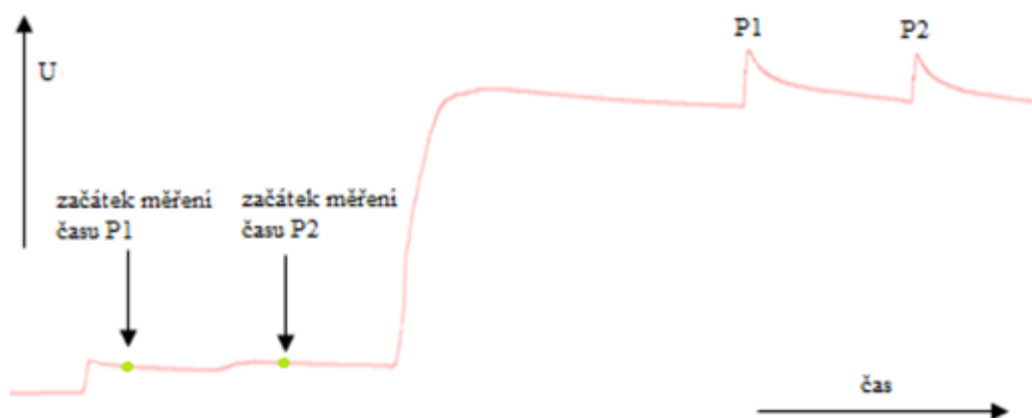
Obrázek 32: Schématické znázornění měřených parametrů

Na základě výpočtů bylo ve zmíněných časech odebíráno barvivo a podle intenzity barvy (Obrázek 33) byl zvolen vhodný čas odběru, který činil 245 s od začátku detekované zóny.



Obrázek 33: Izotachoforetický záznam Azokarminu G se zaznamenanými odběry frakcí. Elektrolytový systém I (pH 2,4)

Dále byl proveden odběr frakce prolinu P1 a hydroxyprolinu H1 v čase 245 s od začátku první zóny prolinu či hydroxyprolinu a další frakce P2 a H2 byla odebrána za 245 s od začátku druhé zóny (Obrázek 34 a 35).



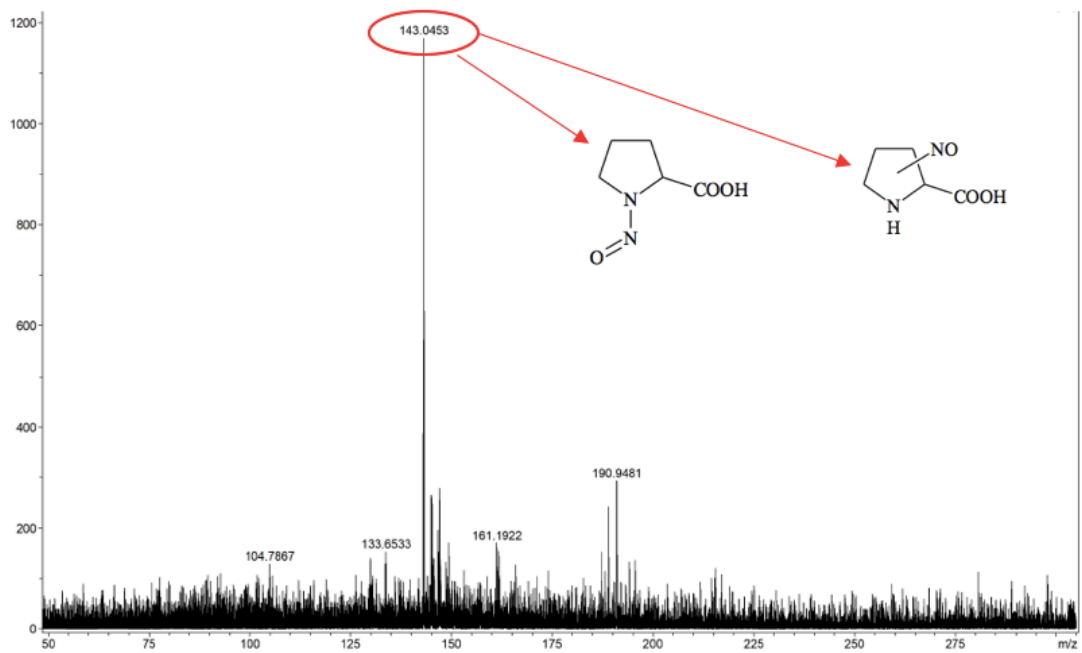
Obrázek 34: Odběr konvertovaného prolinu (4,3 mM roztok). Elektrolytový systém I (pH 2,4)



Obrázek 35: Odběr konvertovaného hydroxyprolinu (3,8 mM roztok). Elektrolytový systém I (pH 2,4)

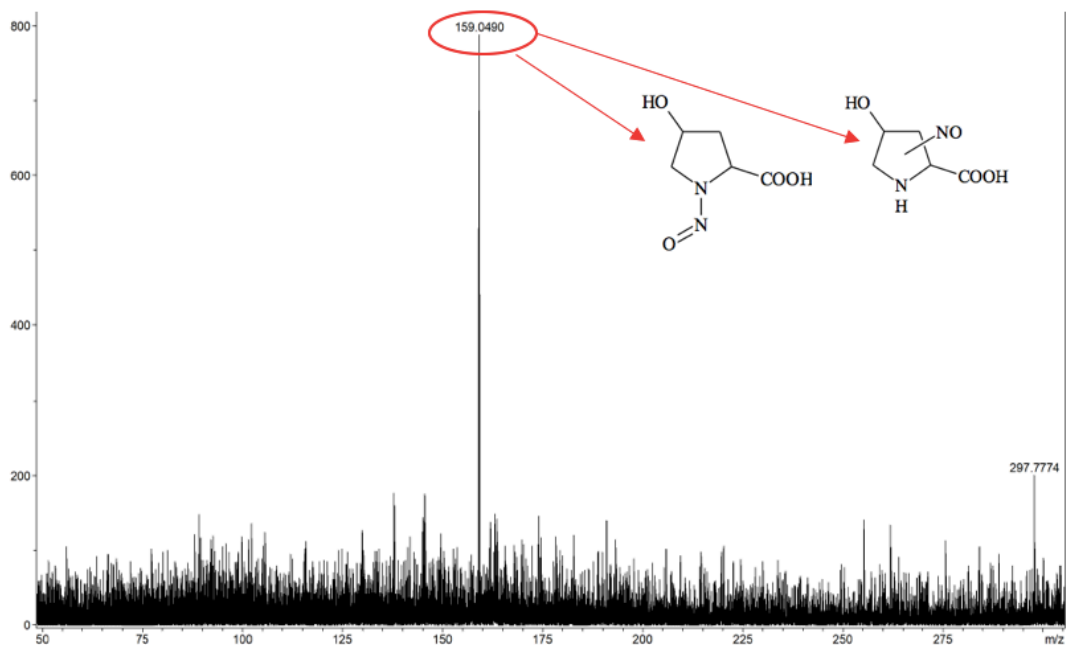
Odebrané frakce byly proměřeny pomocí hmotnostního spektrometru (Obrázek 36 a 37) a díky MS spektrům deprotonovaných molekul bylo zjištěno, jak je prolin a hydroxyprolin konvertován. Pro obě frakce prolinu, a stejně tak hydroxyprolinu, byla získána stejná hmotnostní spektra, proto je dále uvedeno jen jedno pro každou aminokyselinu. Ve spektru prolinu je patrný pouze jeden pík o hodnotě  $m/z$  143,0453.

Zjištěná hodnota  $m/z$  odpovídá hmotnosti nitrosoprolinu, což potvrzuje fakt, že sekundární aminy reagují s kyselinou dusitou za vzniku nitrosaminů. Jeden z produktů konverze prolinu je s největší pravděpodobností *N*-nitrosoprolin, jak bylo uvedeno již v Kapitole 2.2.6.1, a druhý z produktů je pravděpodobně také nitrosoprolin, ale z MS spektra není patrné, do jaké polohy se nitroso skupina naváže.



Obrázek 36: MS spektrum konvertovaného prolinu

Produkty hydroxyprolinu jsou ekvivalentní produktům prolinu při  $m/z$  159,0490, tudíž jeden produkt je *N*-nitrosohydroxyprolin a druhý z produktů je pravděpodobně nitrosohydroxyprolin, ale opět není z MS spektra patrné, do jaké polohy se nitroso skupina naváže.



Obrázek 37: MS spektrum konvertovaného hydroxyprolinu

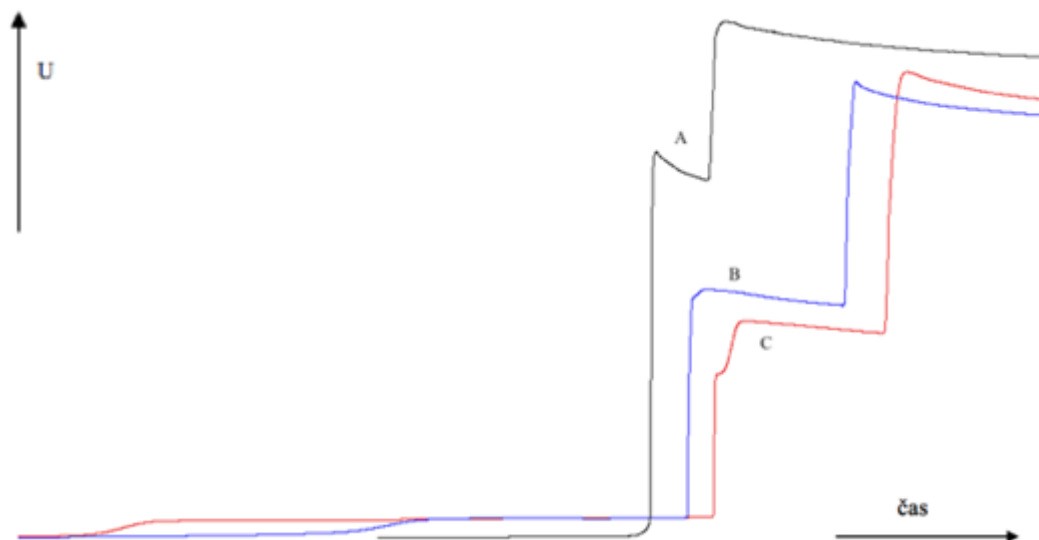
## 4.2 Asparagin a kyselina asparagová

Nejprve byl připraven roztok kyseliny asparagové viz Kapitola 3.2, který byl proměřen na izotachoforetickém analyzátoru za použití elektrolytového systému II při pH 3,6 bez konverze, jelikož samotná kyselina asparagová má záporný náboj, tudíž může migrovat jako aniont.



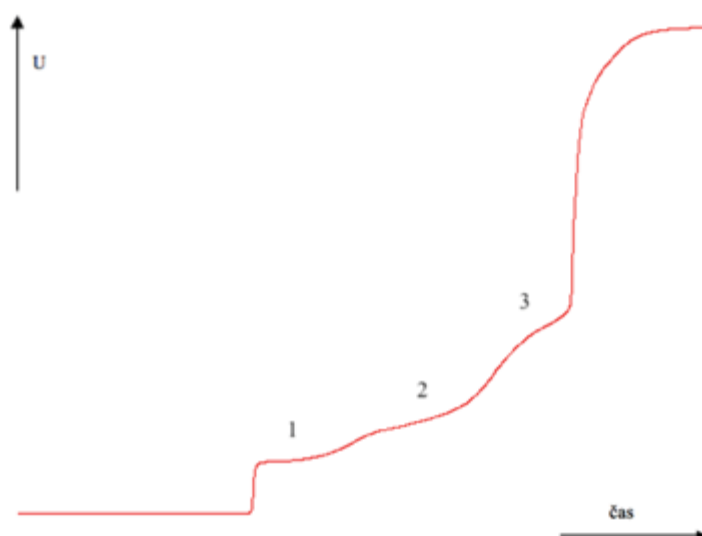
Obrázek 38: Izotachoforetický záznam kyseliny asparagové (0,001 M roztok) bez konverze. Elektrolytový systém II (pH 3,6)

Dále byl připraven roztok asparaginu a kyseliny asparagové viz Kapitola 3.3, který byl následně proměřen na izotachoforetickém analyzátoru za použití elektrolytového systému II při pH 3,6. Ze záznamu (Obrázek 39) je patrné, že asparagin i kyselina asparagová tvoří různé zóny, tudíž u obou aminokyselin byla odebírána jen jedna frakce.



Obrázek 39: Izotachoforetický záznam standardů kyseliny asparagové bez konverze (0,001 M roztok) (A), asparaginu (3,78 mM roztok) (B) a kyseliny asparagové (3,76 mM roztok) (C) po konverzi. Elektrolytový systém II (pH 3,6)

Pro přesné načasování odběru pro elektrolytový systém II bylo znovu použito barvivo azokarmin G, které bylo rozpuštěno v destilované vodě a změřeno samostatně na izotachoforetickém analyzátoru. Opět bylo zjištěno, že se dělí na 3 různě barevné zóny (nejrychleji migrující fialová, uprostřed vínová a nejpomalejší růžovočervená), které byly viditelné v předseparační kapiláře a detekovány vodivostním detektorem (Obrázek 40).

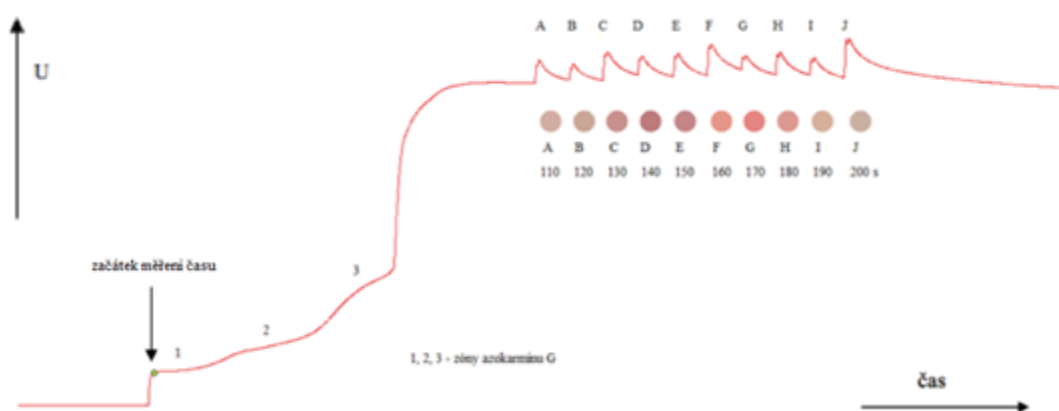


Obrázek 40: Izotachoforetická analýza azokarmínu G – vodivostní záznam. Elektrolytový systém II (pH 3,6)



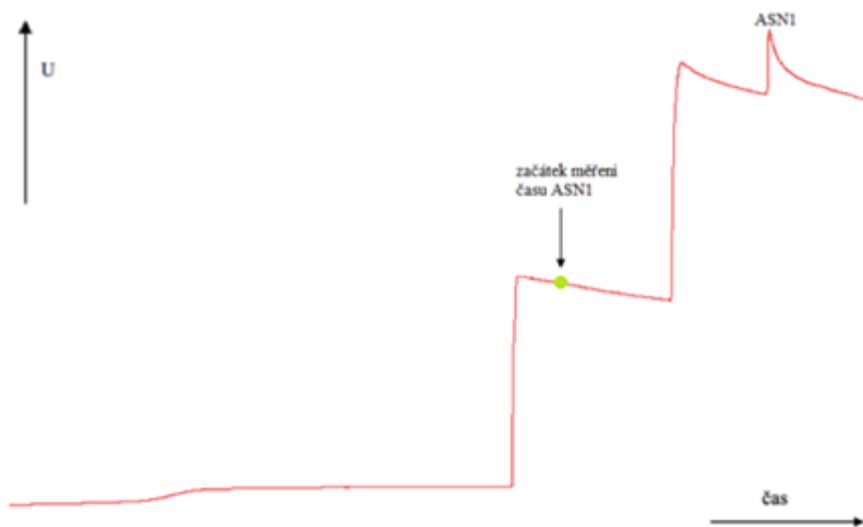
Během analýzy byl změřen čas migrace barviva od nástřiku po detektor, který byl 539 s. Následně byl změřen čas od detektoru po spojku, který činil 286 s. K odběru frakcí byly v tomto případě zvoleny časy 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 a 200 s.

Ve zmíněných časech bylo odebíráno barvivo a podle intenzity barvy (Obrázek 41) byl zvolen vhodný čas odběru, který činil 130 s od začátku detekované zóny.



Obrázek 41: Izotachoforetický záznam azokarminu G se zaznamenanými odběry frakcí. Elektrolytový systém II (pH 3,6)

Dále byl proveden odběr frakce asparaginu ASN1 a kyseliny asparagové ASP1 v čase 130 s od začátku zóny asparaginu či kyseliny asparagové (Obrázek 42 a 43).



Obrázek 42: Odběr konvertovaného asparaginu (3,78 mM roztok). Elektrolytový systém II (pH 3,6)



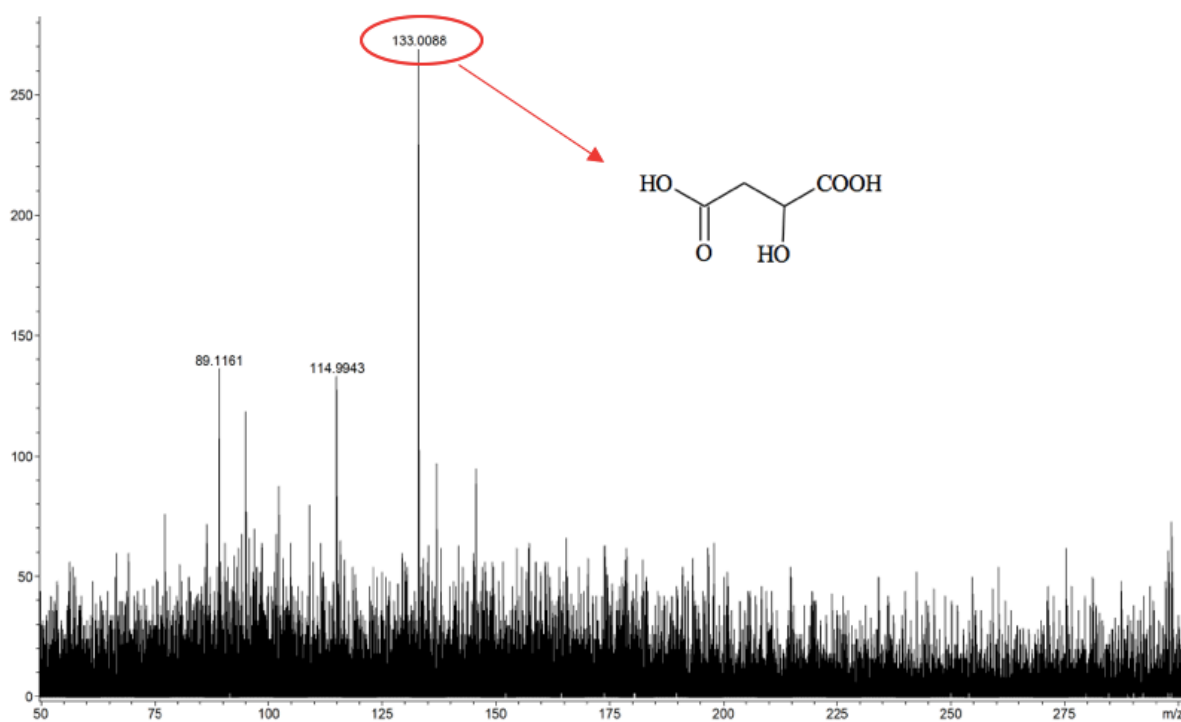
Obrázek 43: Odběr konvertované kyseliny asparagové (3,76 mM roztok). Elektrolytový systém II (pH 3,6)

Odebrané frakce byly analyzovány hmotnostním spektrometrem. Pomocí izotachforeogramů a MS spekter (Obrázek 44 a 45) bylo zjištěno, jak jsou asparagin a kyselina asparagová konvertovány.

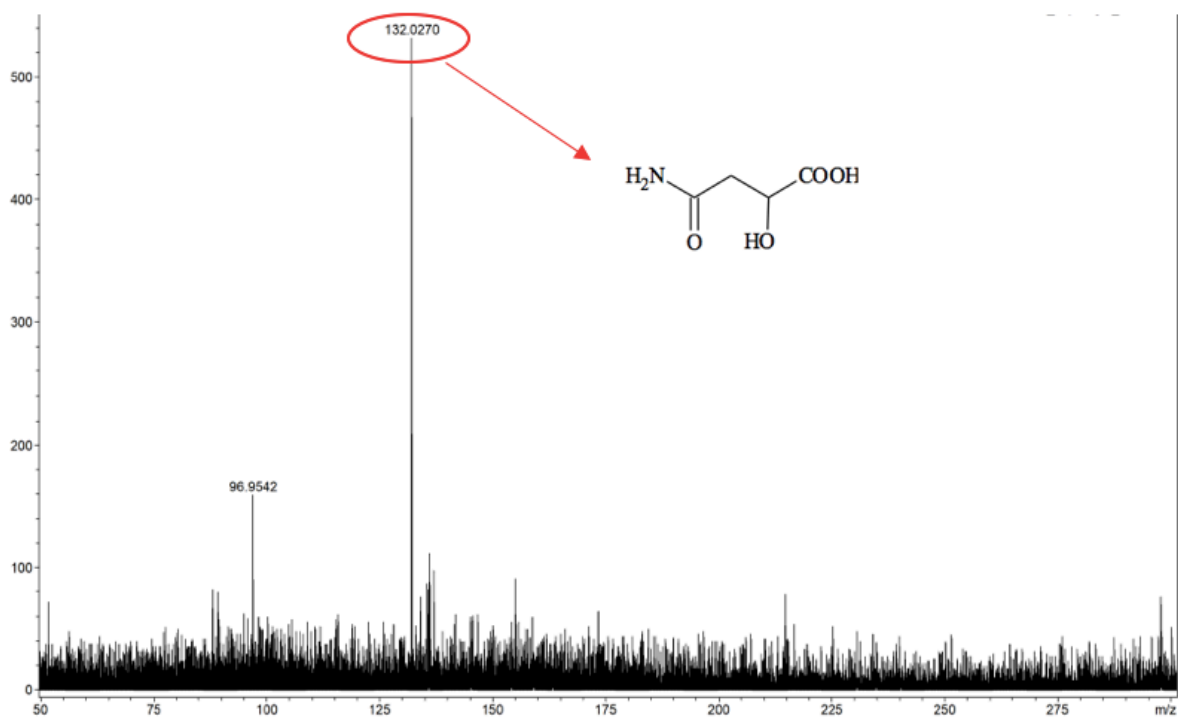
Konvertovaná kyselina asparagová dává jiný izotachforetický záznam než kyselina asparagová bez konverze, což je důkaz, že konverze proběhla. Tento fakt byl potvrzen také pomocí hmotnostního spektra, ve kterém byla detekována

deprotonovaná molekula (záporný iont) o  $m/z$  133,088, která odpovídá deaminované a hydroxylované kyselině asparagové. Konverzí kyseliny asparagové vzniká s největší pravděpodobností příslušná hydroxykyselina, což je kyselina 2-hydroxybutandiová.

V případě asparaginu byl v hmotnostním spektru detekována deprotonovaná molekula (záporný iont) o  $m/z$  132,0270, který také odpovídá vzniku hydroxysloučeniny. K deaminaci u asparaginu může docházet buď přeměnou aminoskupiny na  $\alpha$  uhlíku, čímž by vznikl amid kyseliny 2-hydroxybutandiové, nebo přeměnou amidové skupiny za vzniku kyseliny asparagové. Vzhledem k tomu, že asparagin po konverzi dává jiný izotachoforetický záznam než kyselina asparagová bez konverze (Obrázek 39), lze říci, že k deaminaci dochází na  $\alpha$  uhlíku a vznikajícím produktem je již zmíněný amid kyseliny 2-hydroxybutandiové.



Obrázek 44: MS spektrum konvertované kyseliny asparagové



Obrázek 45: MS spektrum konvertovaného asparaginu

## 5 ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo shrnout všeobecné poznatky o aminokyselinách, zaměřit se hlavně na čtyři konkrétní aminokyseliny (prolin, hydroxyprolin, asparagin a kyselinu asparagovou), na jejich výskyt a fyzikálně-chemické vlastnosti. Dalším cílem bylo vypracování rešerše metod stanovení aminokyselin se zaměřením na elektromigrační separační metody.

Aminokyseliny jsou nedílnou součástí potravy v podobě peptidů a bílkovin. Pokud má člověk pestrou a vyváženou stravu, má aminokyselin dostatek, v opačném případě je možné aminokyseliny doplňovat pomocí doplňků stravy. Aminokyseliny se rozdělují podle postranního řetězce, polarity, ale i podle toho, jak ovlivňují chuť jídla.

V experimentální části byla provedena izotachoforetická separace, během níž byly odebírány frakce jednotlivých aminokyselin, které byly dále analyzovány pomocí hmotnostní spektrometrie, aby bylo stanoveno, o jaké látky se jedná.

Při izotachoforetické separaci se vycházelo z optimálních podmínek, které byly převzaty z předešlých diplomových prací týkajících se izotachoforetického stanovení aminokyselin. Derivatizace aminokyselin probíhala pomocí van Slykeovy reakce, tj. reakce aminokyseliny s kyselinou dusitou připravenou z dusitanu sodného a kyseliny octové.

Byly používány dva elektrolytové systémy lišící se hodnotou pH. Pro odběr frakce byl použit frakcionační kohout, kdy za použití barviva byl načasován odběr, tak aby byl odebrán správný produkt.

Pomocí hmotnostní spektrometrie byla u primárních aminokyselin, tj. kyseliny asparagové a asparaginu, prokázána deaminace a následná hydroxylace za vzniku příslušné hydroxylsloučeniny. Z kyseliny asparagové vzniká 2-hydroxybutandiová kyselina a z asparaginu amid kyseliny 2-hydroxybutandiové. Z hlediska mechanismu reakce jde o nukleofilní substituci. Iminokyseliny prolin a hydroxyprolin reagují s kyselinou dusitou za vzniku nitrosaminů, přičemž vznikají dva produkty, jeden je pravděpodobně N-nitrosoprolin (resp. N-nitrosohydroxyprolin), a druhý je nitrosoprolin (resp. nitrosohydroxyprolin), u kterého pomocí hmotnostní spektrometrie nelze přesně určit do jaké polohy je nitroso skupina navázána.

## 6 LITERATURA

- [1] HOZA, Ignác, SUMCZYNSKI, Daniela, LAZÁRKOVÁ, Zuzana, BUDÍNSKÝ, Pavel. *Potravinářská biochemie I*. 2. vydání. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2011. ISBN 978-80-7318-936-5.
- [2] VELÍŠEK, Jan, HAJŠLOVÁ, Jana. *Chemie potravin I*. 3. vydání. Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-15-2.
- [3] VODRÁŽKA, Zdeněk, KRECHL, Jiří. *Bioorganická chemie*. Praha: SNTL Nakladatelství technické literatury, 1991. ISBN 80-03-00547-7.
- [4] MURRAY, Robert K., GRANNER, Daryl K., MAYES, Peter A., RODWELL, Victor W. *Harperova Biochemie*. 23. vydání (4. české vydání). Jinočany: H & H, 2002. ISBN 80-7319-013-3.
- [5] ŠÍCHO, Vladislav, VODRÁŽKA, Zdeněk, KRÁLOVÁ, Blanka. *Potravinářská biochemie*. 2. vydání. Praha: SNTL, 1981.
- [6] SATHE, Manisha, KAUSHIK, M.P. An efficient method for the esterification of amino acids using silica chloride. *Catalysis Communications*. 2006, 7(9), s. 644-646. ISSN 1566-7367.
- [7] RONWIN, Edward, WARREN, Craig B. Studies on the mechanism of the direct acylation of amino acids and related compounds in nonaqueous solvents. *The Journal of Organic Chemistry*. 1964, 29(8), s. 2276–2279. ISSN 2276-2279.
- [8] HELL, Zoltán, CWIK, Agnieszka, FINTA, Zoltán, HORVÁTH, Zoltán. A new and convenient method for the acylation of amino acids in the presence of a modified zeolite: Ersorb®. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*. 2002, 184(1-2), s. 191-195. ISSN 1381-1169.
- [9] DEYL, Zdeněk, UHROVÁ, Marie. *Chromatografické a elektromigrační metody pro analýzu biologických vzorků*. Pardubice: Univerzita Pardubice, 1996.
- [10] CHURÁČEK, Jaroslav. *Analytická separace látek*. Praha: SNTL, 1990. ISBN 80-03-00569-8.
- [11] ŠIMSA, Daniel, SKOPAL, Jan. Chemická luminiscence luminolu a jeho syntéza ze snadno dostupných chemikálií. *Chemické Listy*. 2008, 102(11), s. 1017-1019. ISSN 1213-7103.

- [12] DAVÍDEK, Jiří. *Laboratorní příručka analýzy potravin*. 2. vydání. Praha: SNTL, 1981.
- [13] KÁŠ, Jan, KODÍČEK, Milan, VALENTOVÁ, Olga. *Laboratorní techniky biochemie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005. ISBN 80-7080-586-2.
- [14] VAN SLYKE, Donald D. A method for the determination of amino nitrogen and its applications. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. New York, 1910, **7**, s. 46-48. ISSN 1525-1373.
- [15] VAN SLYKE, Donald D. A method for quantitative determination of aliphatic amino groups: applications to the study of proteolysis and proteolytic products. *Journal of biological chemistry*. 1911, **9**, s. 185-204. ISSN 1083-351X.
- [16] Van Slyke Method. In: WANG, Zerong. *Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents*. Hoboken. NJ. USA: John Wiley&Sons. 2010. s. 2860-2863. ISBN 978-04-70638-85-9.
- [17] JUREČEK, Miroslav. *Organická analýza II*. Praha: Československá akademie věd, 1957.
- [18] MACHÁČEK, Vladimír, PANCHARTEK, Josef, VEČEŘA, Miroslav. *Organická chemie*. 2. část. 3. vydání. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2005. ISBN 80-7194-763-6.
- [19] KAISER, Floyd E., GEHRKE, Charles W., ZUMWALT, Robert W., KUO, Kenneth C. Amino acid analysis. *Journal of Chromatography*. 1974, **94**, s. 113-133. ISSN 1570-0232.
- [20] COOPER, Catherine, PACKER, Nicolle, WILLIAMS, Keith. *Amino acid analysis protocols*. In: *Methods in Molecular Biology*. Volume 159. Totowa, NJ: Humana Press, 2001. ISBN 978-1-59259-047-6.
- [21] KATAOKA, Hiroyuki, MATSUMURA, Sayuri, YAMAMOTO, Shigeo, MAKITA, Masami. Capillary gas chromatographic analysis of protein and nonprotein amino acids in biological samples. In: *Methods in Molecular Biology: Amino Acid Analysis Protocols*. Editors: COOPER, Catherine, PACKER, Nicolle, WILLIAMS, Keith. Volume 159. Totowa, NJ: Humana Press, 2001, s. 101-122. ISBN 978-1-59259-047-6.

- [22] KATAOKA, Hiroyuki, SAKIYAMA, Norihisa, UENO, Yukizo, NAKAI, Kiyohiko, MAKITA, Masami. Analysis of *o*-phosphoamino acids in biological samples by gas chromatography with flame photometric detection. In: *Methods in Molecular Biology: Amino Acid Analysis Protocols*. Editors: COOPER, Catherine, PACKER, Nicolle, WILLIAMS, Keith. Volume 159. Totowa, NJ: Humana Press, 2001, s. 183-206. ISBN 978-1-59259-047-6.
- [23] BARTOLOMEO, Maria Paola, MAISANO, Federico. Validation of a reversed-phase HPLC method for quantitative amino acid analysis. *Journal of Biomolecular Techniques*. 2006, **17**(2), s. 131–137. ISSN 1524-0215.
- [24] FABIANI, A., VERSARI, A., PARPINELLO, G.P., CASTELLARI, M., GALASSI, S. High-Performance Liquid Chromatographic analysis of free amino acids in fruit juices using derivatization with 9-fluorenylmethylchloroformate. *Journal of Chromatographic Science*. 2002, **40**(1), s. 14-18. ISSN 1945-239X.
- [25] SOGA, Tomoyoshi, HEIGER, David N. Amino acid analysis by capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical Chemistry*. 2000, **72**(6), s. 1236-1241. ISSN 1520-6882.
- [26] HEINRIKSON, Robert L., MEREDITH, Stephen C. Amino acid analysis by reverse-phase High-Performance Liquid Chromatography: Precolumn derivatization with phenylisothiocyanate. *Analytical Biochemistry*. 1984, **136**(1), s. 65-74. ISSN 0003-2697.
- [27] PRATA, Carla, BONNAFOUS, Pierre, FRAYSSE, Nicolas, TREILHOUT, Michel, POINSOT, Verena, COUDERC, François. Recent advances in amino acid analysis by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*. 2001, **22**(19), s. 4129-4138. ISSN 1522-2683.
- [28] SMITH, Joel Timothy. Recent advancements in amino acid analysis using capillary electrophoresis. *Electrophoresis*. 1999, **20**(15-16), s. 3078-3083. ISSN 1522-2683.
- [29] POINSOT, Véréen, BAYLE, Christophe, COUDERC, François. Recent advances in amino acid analysis by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*. 2003, **24**(22-23), 4047-4062. ISSN 1522-2683.



- [30] POINSOT, Véréna, LACROIX, Marlène, MAURY, Delphine, CHATAIGNE, Gabrielle, FEURER, Bernard, COUDERC, François. Recent advances in amino acid analysis by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*. 2006, **27**(1), s. 176-194. ISSN 1522-2683.
- [31] POINSOT, Véréna, CARPÉNÉ, Marie-Anne, BOUAJILA, Jalloul, GAVARD, Pierre, FEURER, Bernard, COUDERC, François. Recent advances in amino acid analysis by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*. 2012, **33**(1), s. 14-35. ISSN 1522-2683.
- [32] POINSOT, Véréna, RODAT, Audrey, GAVARD, Pierre, FEURER, Bernard, COUDERC, François. Recent advances in amino acid analysis by CE. *Electrophoresis*. 2008, **29**(1), s. 207-223. ISSN 1522-2683.
- [33] SIMIONATO, Ana V. Colnaghi, MORAES, Edgar Perin, CARRILHO, Emanuel, TAVARES, Marina Franco Maggi, KENNDLER, Ernst. Determination of amino acids by capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry: An evaluation of different protein hydrolysis procedures. *Electrophoresis*. 2008, **29**(10), s. 2051-2058. ISSN 1522-2683.
- [34] BOČEK, Petr. *Analytická kapilární izotachoforéza*. Praha: Academia, 1987.
- [35] EVERAETS, F.M., VAN DER PUT, A.J.M. Isotachophoresis: The separation of amino acids. *Journal of Chromatography A*. 1970, **52**, s. 415-419. ISSN 1873-3778.
- [36] KUBAČÁK, Peter, MIKUŠ, Peter, VALÁŠKOVÁ, Iva, HAVRÁNEK, Emil. Simultaneous determination of essential basic amino acids in pharmaceuticals by capillary isotachophoresis. *Archiv der Pharmazie Chemistry in Life Sciences*. 2006, **339**(2), s. 96-99. ISSN 0365-6233.
- [37] ROBINSON, D. V., RIMPLER, M. Isotachophoretic analysis of serum for aspartic acid, asparagine, glutamic acid and glutamine. *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*. 1978, **16**(1), s. 1-4. ISSN 0340-076X.
- [38] PREST, Jeff E., BALDOCK, Sara J., FIELDEN, Peter R., GODDARD, Nicholas J., TREVES BROWN, Bernard J. Analysis of amino acids by miniaturised isotachophoresis. *Journal of Chromatography A*. 2004, **1051**(1-2), s. 221-226. ISSN 1873-3778.

- [39] VYAS, Chandni A., MAMUNOORU, Manasa, SHACKMAN, Jonathan G. Amino acid measurements from a high conductivity matrix by gradient elution isotachopheresis. *Chromatographia*. 2009, **70**(1), s. 151-156. ISSN 1612-1112.
- [40] MAMUNOORU, Manasa, JENKINS, Ronald J., DAVIS, Nejea I., SHACKMAN, Jonathan G. Gradient elution isotachopheresis with direct ultraviolet absorption detection for sensitive amino acid analysis. *Journal of Chromatography A*. 2008, **1202**(2), s. 203-211. ISSN 1873-3778.
- [41] ZGOLA-GRZEŚKOWIAK, Agnieszka, GRZEŚKOWIAK, Tomasz. Determination of glutamic acid and aspartic acid in tomato juice by capillary isotachopheresis. *International Journal of Food Properties*. 2012, **15**(3), s. 628-637. ISSN 1532-2386.
- [42] KÁŠ, Jan, KODÍČEK, Milan, VALENTOVÁ, Olga. *Laboratorní techniky biochemie*. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2005. ISBN 80-7080-586-2.
- [43] Proline. *PubChem* [online]. 2004, 16.9.2004 [citováno 11.4.2018]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/L-proline>
- [44] NEUBERGER, Albert, DEENEN VAN, Laurens L. M. *Amino acid metabolism and sulphur metabolism*. Amsterdam: Elsevier, 1981. ISBN 0-444-80257-6.
- [45] KULHÁNEK, Jaromír. *Izotachoforetické stanovení aminokyselin*. Pardubice, 2011. Diplomová práce. Univerzita Pardubice.
- [46] Hydroxyproline. *PubChem* [online]. 2004, 16.9.2004 [citováno 11.4.2018]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/L-Hydroxyproline>
- [47] MICHÁLKOVÁ, Hana. *Chemická analýza kostí a její význam*. Pardubice, 2017. Bakalářská práce. Univerzita Pardubice.
- [48] Asparagine. *PubChem* [online]. 2004, 16.9.2004 [citováno 11.4.2018]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/L-asparagine>
- [49] Aspartic Acid. *PubChem* [online]. 2004, 16.9.2004 [citováno 11.4.2018]. Dostupné z: [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/L-aspartic\\_acid](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/L-aspartic_acid)
- [50] LÜLLMANN-RAUCH, Renate. *Histologie*. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-24737-29-4.

- [51] MICHAELIS, L. Rosinduline as oxidation-reduction indicator. *Journal of biological chemistry*. 1931, **91**, s. 369-372. ISSN 1083-351X.
- [52] Acid Red 101. *PubChem* [online]. 2007, 30.4.2007 [citováno 27.3.2018].  
Dostupné z: [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Azocarmine\\_G](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Azocarmine_G)